

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## OBSAH MLÉČNÝCH BAKTERIÍ VE VYBRANÝCH TYPECH PROBIOTICKÝCH POTRAVIN

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

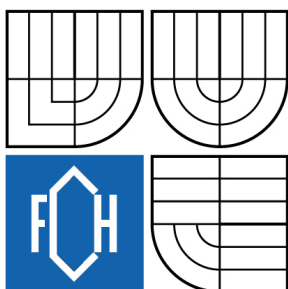
AUTHOR

Bc. ALENA PÁTEROVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ  
FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## OBSAH MLÉČNÝCH BAKTERIÍ VE VYBRANÝCH TYPECH PROBIOTICKÝCH POTRAVIN

THE CONTENT OF LACTIC ACID BACTERIA IN SEVERAL TYPES OF PROBIOTIC FOODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. ALENA PÁTEROVÁ

VEDOUcí PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0404/2009</b>	Akademický rok: <b>2009/2010</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Alena Páterová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Eva Vítová, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Obsah mléčných bakterií ve vybraných typech probiotických potravin

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
  - charakteristika, vlastnosti, biologické účinky mléčných bakterií
  - jejich vliv na lidské zdraví
  - možnosti stanovení mléčných bakterií v potravinách
  - nabídka probiotických potravin na českém trhu
2. Vyberte metodu vhodnou pro stanovení mléčných bakterií
3. Sledujte obsah mléčných bakterií ve vybraných typech potravin
4. Zhodnoťte jejich kvalitu a účinnost z hlediska obsahu mléčných bakterií

### Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Alena Páterová  
Student(ka)

-----  
Ing. Eva Vítová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které mají po požití pozitivní vliv na zdraví člověka i zvířat. Nejznámějšími probiotiky jsou bakterie mléčného kvašení, z nichž se nejčastěji používají laktobacily a bifidobakterie. Za terapeutické minimum se považuje denní konzumace alespoň 100 g mléčného výrobku s minimálním obsahem  $10^6$  probiotických bakterií v 1 g nebo v 1 ml. V této práci bylo vybráno několik výrobků, které deklarovaly na obalu probiotickou kulturu. Všechny výrobky byly podrobeny analýze na počet mléčných bakterií. Pro kultivaci byly použity dvě média – MRS agar a Modified skim milk agar. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 48 hodin za aerobních i anaerobních podmínek. Množství živých bakterií, které musí být ve výrobku přítomno, udává vyhláška Ministerstva Zemědělství č. 77/2003 Sb.. Kvantitativní zastoupení mléčných bakterií ve všech vybraných výrobcích vyhovovalo požadavkům legislativy.

## **ABSTRACT**

Probiotics are defined as live microorganisms that have, if ingested, a positive impact on human and animals health. The best known probiotics are the lactic acid bacteria, among them most commonly used are lactobacilli and bifidobacteria. For therapy the minimum daily consumption of at least 100 g of milk product with a minimum  $10^6$  of probiotic bacteria in 1 g or 1 ml is considered. In this work, several products that have declared on the label probiotic cultures have been selected. All products were analyzed for the number of lactic acid bacteria. Two media - MRS agar and skim milk agar Modified were used for cultivation. Cultivation proceeded at 37 °C for 48 hours under aerobic and anaerobic conditions. Amount of live bacteria, which must be present in the product, indicates Ministry of Agriculture No. 77/2003 Coll.. Quantitative representation of lactic acid bacteria in all selected products comply with the requirements of legislation.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

mléčné bakterie, probiotické potraviny

## **KEYWORDS**

lactic acid bacteria, probiotic foods

PÁTEROVÁ, A. *Obsah mléčných bakterií ve vybraných typech probiotických potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 100 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem úplně a správně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být komerčně využita jen se souhlasem vedoucí diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych touto cestou poděkovat Ing. Evě Vítové za odborné vedení, cenné rady, připomínky, pomoc, trpělivost a čas, který mi věnovala při vypracování této diplomové práce.

## OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1. Mléčné bakterie .....	8
2.1.1. Definice .....	8
2.1.2. Nejdůležitější rody bakterií mléčného kvašení .....	9
2.2. Probiotika .....	14
2.2.1. Historie probiotik .....	14
2.2.2. Co jsou to probiotika .....	15
2.2.3. Požadované vlastnosti probiotických bakterií .....	15
2.2.4. Vliv probiotik na zdraví .....	16
2.2.5. Prebiotika, vláknina, synbiotika .....	23
2.3. Možnost použití mléčných bakterií jako probiotik .....	23
2.3.1. Fermentované potraviny .....	24
2.3.2. Bakterie využitelné jako probiotika .....	26
2.3.3. Faktory ovlivňující množství probiotik ve fermentovaném výrobku .....	28
2.3.4. Průmyslové použití probiotických bakterií .....	29
2.4. Možnost stanovení mléčných bakterií v potravinách .....	29
2.4.1. Metody identifikace bifidobakterií a laktobacilů .....	29
2.5. Zhodnocení nabídky probiotických potravin v ČR .....	32
2.5.1. Potravinové doplňky v potravinách .....	33
2.5.2. Potravinové doplňky ve formě kapslí .....	35
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	39
4.1. Materiál .....	39
4.1.1. Živná média .....	39
4.1.2. Chemikálie pro barvení .....	40
4.1.3. Roztoky .....	40
4.1.4. Přístroje a pomůcky .....	40
4.2. Metody .....	41
4.2.1. Příprava živných pěst .....	41
4.2.2. Příprava vzorku .....	41
4.2.3. Kultivace .....	41
4.2.4. Barvení podle Grama .....	41
4.3. Výsledky .....	41
4.3.1. Výsledné průměrné počty mléčných bakterií ve vybraných výrobcích .....	42
4.4. Diskuze .....	70
4.4.1. Srovnání živných médií .....	70
4.4.2. Srovnání výrobků .....	70
5. ZÁVĚR .....	85
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	86
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	95
8. PŘÍLOHY .....	96
8.1. Preparáty Gramovo barvení - Actimel .....	96
8.2. Preparáty Gramovo barvení - Activia .....	96
8.3. Preparáty Gramovo barvení - Holandia .....	97

8.4. Preparáty Gramovo barvení - Kefír .....	97
8.5. Preparáty Gramovo barvení - Revital.....	98
8.6. Preparáty Gramovo barvení - Zeus .....	98
8.7. Preparáty Gramovo barvení - Hádes .....	99
8.8. Petriho misky po kultivaci na MSMA.....	99
8.9. Petriho misky po kultivaci na MRS .....	100

## 1. ÚVOD

Živé kultury, probiotika, laktobacily, bifidobakterie - to jsou slova, která mnozí z nás ještě před časem neslyšeli a nyní se objevují téměř ve všech reklamách na mléčné i jiné výrobky. Lidé se začínají zajímat nejen z důvodu reklamy, ale zejména z důvodů zdravotních, ať už matky pro své děti, či dospěli pro sebe sami.

Původ slova probiotický pochází z řečtiny a znamená „pro život“. Jedná se tedy o životaschopné mikroorganismy, jejichž velká část patří mezi bakterie mléčného kvašení. Jsou to především kmeny rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, k jejichž příznivým účinkům je potřeba dostatečné množství, schopnost přežít průchod trávicím traktem, kde odolávají kyselému prostředí, a schopnost se v místě působení množit. Nezbytné také je, aby se probiotické bakterie aplikovaly do výrobku živé a svoji životaschopnost si zachovávaly po co nejdelší dobu, minimálně však do doby spotřeby probiotického výrobku, jedině tak zlepšují zdravotní stav hostitele.

Prvními probiotickými výrobky v Evropě byly kysané mléčné výrobky. Nyní jsou však v této skupině zahrnuty i další druhy potravin, např. další mléčné produkty, masné výrobky, nápoje a kvašené výrobky obecně. Na našem trhu najdeme také probiotika ve formě tablet či kapslí.

Velkou výhodou probiotických potravin je, že jsou vhodné pro všechny věkové kategorie, zejména pak pro starší populaci a pro lidi se střevními potížemi. Probiotické bakterie udržují v rovnováze mikroflóru střeva, čímž zmírňují potíže způsobené léčbou antibiotiky, infekcí, chirurgickým zákrokem, onemocněním jater a ledvin, poruchách imunity, průjmami nebo naopak zácpou a řadu dalších. Pro dosažení nápravy těchto symptomů, tedy ke zlepšení zdraví, je podstatná pravidelná konzumace v dostatečném množství. Za terapeutické minimum se považuje denní konzumace alespoň 100 g mléčného výrobku s minimálním obsahem  $10^6$  probiotických bakterií v 1 g nebo v 1 ml.

Současně s pojmem probiotika se objevuje pojem prebiotika. Tyto složky se řadí mezi funkční potraviny a vzájemně tvoří synbiotika, u nichž se očekává synergický účinek těchto dvou složek. Nejjednodušším příkladem synbiotika pro lidskou výživu je jogurt s obsahem probiotických bifidobakterií a prebiotickou oligofruktózou. Podobně jako probiotika mají funkční potraviny významný vliv na zdraví člověka.

Tato práce shrnuje poznatky o problematice probiotik, jejich vlivu na lidské zdraví a také stručný přehled probiotických produktů dostupných na našem trhu. V experimentální části je zhodnocení kvantitativního zastoupení mléčných bakterií v probiotických potravinách a porovnání jednotlivých výrobků.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Mléčné bakterie

#### 2.1.1. Definice

Bakterie mléčného kvašení tvoří skupina kokovitých i tyčinkovitých bakterií, zahrnující některé druhy rodů: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium*. Z potravinářského a mikrobiologického hlediska má tato skupina velký funkční význam.

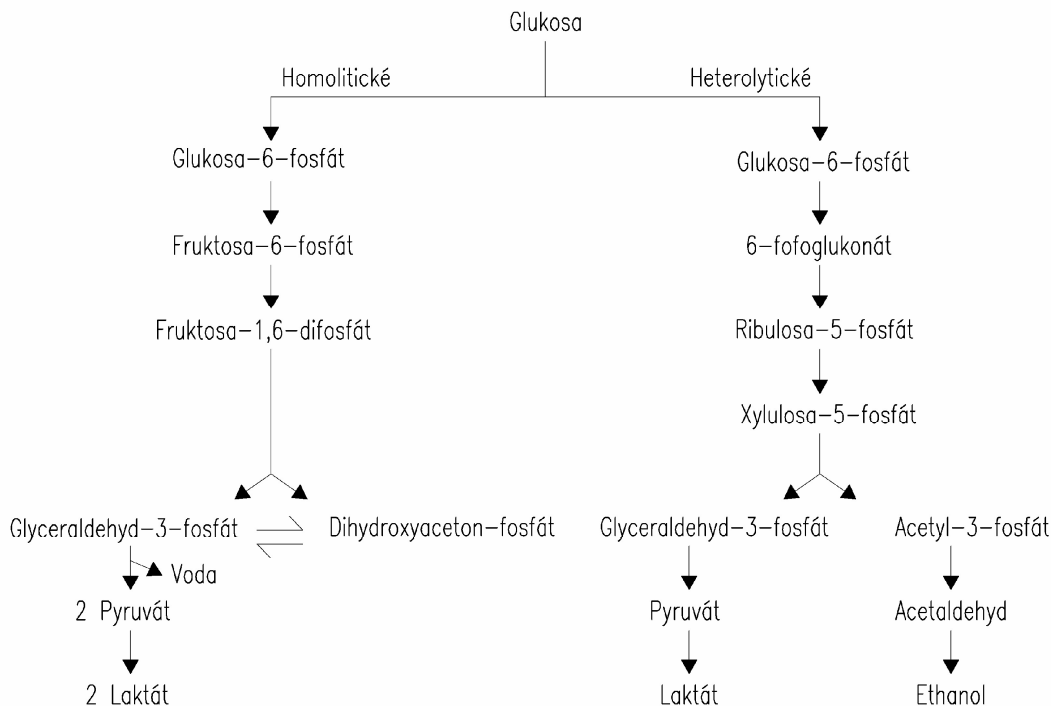
Pravé bakterie mléčného kvašení tvoří skupinu nepohyblivých, nesporulujících, grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních podmínek a tvoří přitom hlavně kyselinu mléčnou.

Bakterie mléčného kvašení jsou neustále v soutěži s ostatními skupinami bakterií vyskytujícími se v potravinách. Ve svém fermentativním metabolismu produkují látky a vytvářejí podmínky, které jsou pro jiné (obvykle nežádoucí) bakterie škodlivé. [1]

Mléčné bakterie jsou mikroorganismy, které jsou přítomny jako součást mikroflóry v dutině ústní, gastrointestinálním traktu a vagině člověka i zvířat. Hrají důležitou roli ve výrobě kvašených mléčných produktů, např. jogurtů, kefírů, ale také při zpracování masa a uzenin nebo při výrobě piva a vína. Léčebná hodnota kvašených mléčných výrobků byla nalezena již antickými lékaři. Před mnoha staletími lékaři z dálného a blízkého východu předepisovali kvašené mléko při léčbě žaludečních a zažívacích poruch a jaterních onemocnění. [2, 3, 4]

Všechny mléčné bakterie produkují kyselinu mléčnou z hexosy a pokud nedostačují řetězce s transportními elektrony a profunkční Krebsův cyklus, získávají energii fosforylací. Produkovaná kyselina mléčná může být L (+), nebo méně často D (-) a nebo směs obou. Poznamenejme, že D (-) kyselina mléčná není metabolizována člověkem a doporučována pro děti. Tento fakt je využíván výrobcí kmene *Lactobacillus bavaricus* v Německu k produkci speciálně L (+) kyselého zelí.

Cesty, kterými jsou hexosy metabolizovány, rozdělují bakterie kyseliny mléčné na dvě skupiny, homofermentativní a heterofermentativní (obr.1.). Ve zkratce, homofermentátoři jako rod *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a některé laktobacily, produkují kyselinu mléčnou jako hlavní nebo jediný koncový produkt fermentace glukosy. Nicméně při změnách růstových podmínkách a když je pentosa iniciální substrát, se to může změnit. Homofermentátoři používají cestu Embden-Meyerhof-Parnas k vytvoření dvou molů laktátu na jeden mol glukosy a získají tak přibližně dvakrát více energie na jeden mol glukosy než heterofermentátoři. Heterofermentátoři, jako například rod *Weissella* a *Leuconostoc* a některé laktobacily, produkují z glukosy ekvimolární množství laktátu, CO<sub>2</sub> a etanolu, přes hexoso-monofosfátovou nebo pentosovou cestu. [5]



Obr. 1 . Metabolismus glukosy [5]

### 2.1.2. Nejdůležitější rody bakterií mléčného kvašení

Aplikace molekulárně biologických metod v klasifikaci mléčných bakterií vedla v posledních letech k velkým změnám v jejich taxonomii a v současné době zahrnuje tato skupina řadu rodů (*Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Weissella*). [4, 6]

Rod *Streptococcus* a *Enterococcus* jsou všeobecně považovány za patogenní s výjimkou *Streptococcus thermophilus* a *Streptococcus macedonicus*, které jsou bezpečné a hrají důležitou roli v mléčném kvašení. [7]

#### 2.1.2.1. Rod *Streptococcus*

Rod bakterií, jejichž název je utvořen ze dvou řeckých slov: streptos = řetízek a kok = kulička. Streptokoky jsou grampozitivní koky s buňkami okrouhlého až ovoidního tvaru. Seskupují se do dvojic nebo řetízků různé délky, netvoří spory a jsou nepohyblivé. Jsou to fakultativně anaerobní, homofermentativní a katalasa negativní mikroorganismy.

Mezi hlavní účinky patří fermentace sacharidů na kyselinu mléčnou, přičemž některé druhy fermentují i organické kyseliny a aminokyseliny. Neredukují dusičnany na dusitany.

Teplotní optimum je kolem 37 °C a níže, s výjimkou druhu *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Rod obsahuje druhy komenzální, parazitické až choroboplodné druhy pro lidi i zvířata. Saprophytické druhy se vyskytují v přírodě a v potravinách a mají významné využití v potravinářském průmyslu. Tyto druhy se zahrnují do nových rodů *Lactococcus* a *Enterococcus*.

Podle hemolytických vlastností se streptokoky rozdělují na  $\alpha$ -hemolytické,  $\beta$ -hemolytické a  $\gamma$ -hemolytické neboli anhemolytické. Alfa-hemolysa se objevuje kolem kolonií tzv. viridujících neboli  $\alpha$ -hemolytických streptokoků, z latinského viridis = zelený. Projevuje se jako zelenavé nebo zelenošedé zbarvení kolonií a je způsobena pouze částečným rozkladem hemoglobinu na methemoglobin. Beta-hemolytické označují úplnou hemolysu a projevuje se jako zóna vyjasnění kolem  $\beta$ -hemolytických streptokoků. Nastává úplným rozkladem krevního barviva. Někdy se ještě uvádí  $\gamma$ -hemolysa, jež však znamená nepřítomnost hemolysy, neboť enterocyty zůstávají nedotčené.

Patogenní streptokoky tvoří některé produkty s enzymatickou aktivitou, jež se podílí na jejich choroboplodnosti. [1, 8]

### Nepatogenní druhy streptokoka

#### *Streptococcus salivarius*

Z latinského saliva = slina. Vyskytuje se společně se *Streptococcus mitis* v dutině ústní a ve slinách. Roste jako  $\gamma$ -hemolytický streptokok, tzn. že půda kolem kolonií zůstává nezměněná. Tento streptokok je považován za nepatogenní, i když byly popsány jím vyvolané sepse. Je fakultativním anaerobem a roste při teplotě 45 °C, ale při teplotě 10 °C již neroste, třicetiminutový záhřev na 60 °C nepřežívá.

#### *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

Dříve *Streptococcus thermophilus*. Jsou to kulaté bakterie velikosti 0,7 - 0,9  $\mu\text{m}$ . Z hlediska nároku na kyslík se řadí mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy. Optimální růstová teplota se pohybuje v rozpětí 40 – 45 °C, přežívá třicetiminutový záhřev na 65 °C, ale při 10 °C již neroste. Laktosu zkvašuje homofermentativně na kyselinu mléčnou, a je proto důležitý při mléčném kysání v mladých tvrdých sýrech. Je také nepostradatelnou složkou jogurtů a součástí ementálské kultury.

### Patogenní druhy streptokoka

#### *Streptococcus agalactiae*

Mohou být původci infekcí močových cest a hnisavých afekcí. K jejich identifikaci se používá tzv. CAMP-testu (test pro identifikaci skupiny beta - streptokoků na základě jejich tvorby látky - CAMP faktor, který rozšiřuje oblast hemolysy tvořenou streptokokovým beta-hemolysinem). Jednotlivé bakteriální buňky mají kulatý nebo oválný tvar a velikost 0,6 - 1,2  $\mu\text{m}$ . Vyskytují se často v dlouhých řetězcích. V mléce rostou dobře a často v něm tvoří až 0,5 % kyseliny mléčné.

#### *Streptococcus dysgalactiae*

Neroste při teplotě 10 °C a také při 45 °C. Vyskytuje se v mléce krav se zánětem vemene.

#### *Streptococcus pneumoniae*

Běžně se označuje jako pneumokok. Představuje grampozitivní koky typicky se vyskytující ve dvojicích. Pro svůj lanceovitý (kopijovitý) tvar se dříve nazýval *Diplococcus lanceolatus*. Bakteriální buňky jsou ovoidní, na straně obrácené k druhému členu dvojice poněkud zploštělé. Toto zploštění je pro *Streptococcus pneumoniae* charakteristické. Okolo

pneumokoků vyrostlých v mukoidní fázi je zřetelné polysacharidové pouzdro, které brání jejich fagocytóze. Virulence je tedy přímým výsledkem tvorby a přítomnosti pouzdra. Pneumokoky se uplatňují jako původci onemocnění dýchacích cest, způsobují bronchitidy a lobární pneumonii. Jsou běžným nálezem na sliznicích horních cest dýchacích i u zdravých osob.

#### *Streptococcus pyogenes*

V doslovném překladu „pyogenes“ - tvořící hnis, z řeckých slov pyón = hnis, gennaó = tvořím. Vyvolává onemocnění dýchacího ústrojí, např. pneumonii, hnisavé infekce kůže, otitidy, mastitidy i infekce kostí. Z kožních onemocnění způsobuje jak povrchové infekce (např. impetigo), tak infekce hluboké (např. celulitidu). Velmi závažné jsou postinfekční následky, zvláště revmatická horečka nebo akutní glomerulonefritida. Může se však vyskytovat v dutině ústní a v oblasti nosohltanu a přitom nezpůsobovat žádné onemocnění. Člověk je nosičem pyogenního streptokoku, který je u něho součástí normální mikroflóry. Proto je zhodnocení nálezu tohoto streptokoka někdy dosti obtížné.

Pokud se *Streptococcus pyogenes* nalezne v potravě, jde vždy o sekundární kontaminaci nemocným člověkem, který se přímo účastnil zpracování surovin nebo výroby potravinářských produktů.

#### *Streptococcus sobrinus*

Bakterie, které se podílejí na vzniku zubního kazu. Vytvářejí kyselinu mléčnou. *Streptococcus sobrinus* má schopnost kolonizovat povrch zubů, protože má afinitu ke slinným glykoproteinům. Je pravděpodobně primárním mikroorganismem, jenž porušuje zubní sklovinu.

[8]

#### **2.1.2.2. Rod *Lactococcus***

Laktokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, katalasa negativní, mezofilní, homofermentativní bakterie, které mají kokovitý tvar. Buňky mají vejcovitý tvar o průměru 0,5 až 1,0 µm a vyskytují se nejčastěji v párech nebo v kratších řetízích.

Rod *Lactococcus*, označován také jako mléčná skupina rodu *Streptococcus*, zahrnuje druhy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus garvieae* a *Lactococcus plantarium*.

#### *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

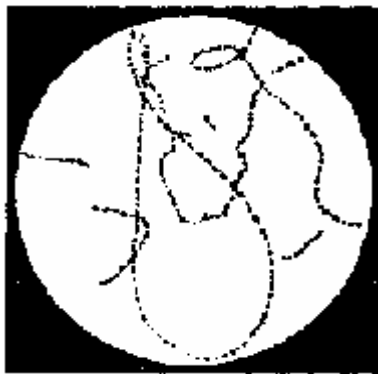
V potravinářství a hlavně v mlékárenství je jedním z nejrozšířenějších mikroorganismů. Je součástí kyselinotvorné složky všech typů základních smetanových kultur používaných v mlékárenství. Tvoří kyselinu mléčnou a malé množství aromatických látek. Buňky mají vejcovitý tvar o průměru 0,5 až 1,0 µm a vyskytují se nejčastěji v párech nebo v kratších řetízích.

Optimální teplota pro růst tohoto druhu je 30 °C, ale snese teploty v rozmezí 10 °C až 40 °C. (Obr. 2.)

#### *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

Velmi často se vyskytuje spolu s *Lactococcus lactis subsp. lactis*, liší se pouze tvorbou větších buněk a delších řetízků v mléku.

Velikosti buněk je mezi 0,6 a 1,0  $\mu\text{m}$ , které tvoří řetízky. Teplotní optimum pro růst tohoto druhu je 28 °C, ale snese teploty v rozmezí 10 °C až 40 °C. [1]



Obr. 2. *Lactococcus lactis subsp. lactis* [8]

#### **2.1.2.3. Rod *Leuconostoc***

Skupina grampozitivních, heterofermentativních, katalasa negativních, fakultativně anaerobních, mezofilních, nesporelujících koků. Nejsou proteolytické, nehemolysují, neredukují dusičnan na dusitan. [1, 8]

##### *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*

Je součástí tzv. máselné kultury. Produkuje biacetyl dodávající vyrobenému máslu příjemné aroma. Je syntetizován z kyseliny citrónové jako vedlejšího produktu mléčného kvašení.

##### *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*

Používá se k výrobě dextransu, vysokomolekulárního polymeru glukosy s relativní molekulovou hmotností 15 tisíc až 20 milionů. Používá se jako náhrada krevní plazmy k udržení funkce krevního oběhu při akutně vzniklých stavech s velkou ztrátou krve. [8]

##### *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*

Vyznačuje se tvorbou charakteristického dextranového slizu, který produkuje ze sacharosy při teplotách 20 - 25 °C. Dříve se nazýval *Streptococcus mesenteroides*. Můžeme ho někdy zjistit u vadných nealkoholických nápojů, sirupů, ovocných šťáv nebo limonád, i v potravinářských polotovarech. Jeho přítomnost v uvedených tekutinách je vždy nežádoucí. [1, 8]

#### **2.1.2.4. Rod *Pediococcus***

Z řeckého pedion = plocha, rovina. Do rodu *Pediococcus* patří grampozitivní aerobní až mikroaerofilní nepohyblivé koky, jež se často seskupují do tetrad. Optimálně rostou při pH 5 - 5,8 a dobře snášejí velmi široké teplotní rozmezí 5 – 45 °C.

Bakterie z rodu *Pediococcus* patří mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení, jejichž hlavním metabolitem při fermentaci sacharidů je racemická a pravotočivá kyselina mléčná. Obvykle se vyskytují spolu se streptokoky, laktobacily a leukonostoky.

V pivovarnictví jsou považovány za škůdce, protože produkují acetoin, který se oxidací vzdušným kyslíkem mění na diacetyl, což nepříznivě ovlivňuje chuť piva.

Pozitivní úlohu mají při fermentaci rostlinných poživatin (kapusty, okurků, zeleninových směsí).

Nejznámější druhy jsou *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* (z latinského acidum lacticum = kyselina mléčná), *Pediococcus halophilus* (snáší až 15% koncentraci NaCl). V Japonsku se uplatňuje při výrobě sýrů „miso“ ze sojové mouky. [1, 8]

#### *Pediococcus acidilactici*

Tvoří kulaté buňky průměru 0,6 - 1,0 µm, které se nejčastěji seskupují do dvojic nebo krátkých řetízků. Je to druh homofermentativní, v mléce produkuje inaktivní kyselinu mléčnou. Optimální teplota růstu se nachází v intervalu 40 – 50 °C.

#### *Pediococcus pentosaceus*

Grampozitivní kokovité bakterie o průměru 1 - 1,3 µm. Vyskytují se ojediněle, ve dvojicích nebo typických tetrádách. Nejlépe se kultivuje v půdě s obsahem kvasničné vody nebo kvasničného autolyzátu či přímo v pivě. Na pevných půdách roste velmi pomalu, kolonie můžeme pozorovat až za 4 - 6 týdnů po naočkování. V tekutých půdách je růst rychlejší. Optimální teplota je 25 °C a nejvhodnější pH 5,8. Při hodnotě pH 7,1 už *Pediococcus pentosaceus* neroste. Doporučuje se také kultivace při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub>, který příznivě působí na jeho rozmnožování.

*Pediococcus pentosaceus* škodí v pivovarnictví, kde může vyvolat tzv. sarcinovou nemoc piva projevující se typickou příchutí po diacetylu, sedlinou a zákalem v kontaminovaném nápoji. Často se vyskytuje na ječmeni, odkud se sladem dostává do piva. [8]

#### **2.1.2.5. Rod *Weissella***

Rod *Weissella* byl popsán v roce 1993 Collinsem a kol. při studiu kmenů atypických leukonostoků izolovaných z řeckých fermentovaných uzenin. Rod *Weissella* tvoří grampozitivní kokotyčky, které mohou připomínat jak leukonostoky, tak tyčinkovité formy, které jsou morfologicky podobné některým laktobacilům. Jejich biochemická identifikace je velmi problematická a pro spolehlivé odlišení tohoto rodu od jiných mléčných bakterií je nezbytné použití chemotaxonomických či molekulárně biologických metod. [9, 10]

#### **2.1.2.6. Rod *Enterococcus***

Rod *Enterococcus* patří mezi podmíněně patogenní mikroorganismy, tvoří významnou součást probiotických preparátů určených k harmonizaci mikroflóry trávicího ústrojí hospodářských zvířat. Jeho název je tvořen z řeckých slov: enteron = střevo a kokkos = kulaté jádro. Enterokoky obývají střevní systém člověka a zvířat. V hygienické mikrobiologii a vodohospodářské praxi se považují za indikátory fekálního znečištění nejen potravinářských výrobků, ale i pitné nebo povrchové vody.

Enterokoky zahrnují grampozitivní, katalasa negativní koky, které nikdy netvoří spory. Vyznačují se vysokou fyziologickou tolerancí – růst v bujónu se 6,5 % NaCl, se 40 % žluči, při 10 °C a přežívají teploty 60 °C za 30 minut.

V potravinářství se enterokoky často z nevědomosti považují za indikátory fekálního znečištění. Neredukují dusičnan na dusitan, nerozkládají celulosu, pektin a tuky. Hlavní čtyři druhy enterokoků jsou: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus furane* a *Enterococcus avium*.

#### *Enterococcus faecalis*

Tvoří vejcovité buňky s průměrem 0,5 – 1,0 µm, uspořádané v páru, v krátkých řetízích. Teplotní optimum je 37 °C. Jsou nepohyblivé a na živných půdách tvoří hladké smetanové až bílé kolonie. Fermentují glukosu za tvorby kyseliny mléčné. Ale při neutralizaci bujónu tvoří i kyselinu mravenčí a octovou a ethanol. V sýrech ementálského typu působí bílou hnilobu a inhibuje tvorbu ok. [1, 8]

#### **2.1.2.7. *Carnobacterium piscicola***

Byla poprvé popsána v roce 1984. Tato bakterie byla několikrát izolována jako původce bakteriálních infekcí u lososovitých ryb. Zatím nebyl popsán případ infekce tímto mikroorganismem u člověka. Obecný popis - grampozitivní, drobné tyčky, fakultativně anaerobní, anaerobně fermentují z glukosy kyselinu mléčnou a další mastné kyseliny. Bakterie je nepohyblivá, netvoří spory, neprodukuje katalasu a netvoří plyn z glukosy. [11]

#### **2.1.2.8. *Oenococcus oeni***

Je vinařská bakterie, která přetváří kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou za ovlivnění aroma, chuti a celkové struktury vína. [12]

## **2.2. Probiotika**

### **2.2.1. Historie probiotik**

První zmínka o výrobcích obsahujících bakterie mléčného kvašení s příznivým účinkem na lidské zdraví sahá do roku 1907, kdy I. Metchnikoff přisuzoval dlouhověkost a pevné zdraví Bulharů konzumaci jogurtů a jiných zakysaných mléčných výrobků. Základem jeho teorie bylo, že bakterie mléčného kvašení v trávicím traktu brzdí nadměrné množení proteolytické mikroflóry, které tvoří pro organismus škodlivé produkty. V roce 1908 získal Nobelovu cenu za výzkum a poznání imunity. [1, 13, 14]

Další významný objev uskutečnil Alfred Nissle v roce 1916, kdy publikoval práci o probiotickém kmeni *Escherichia coli*, který nevykazuje patogenní vlastnosti a má inhibiční vliv na růst jiných mikrobů. V roce 1917 začala farmaceutická firma vyrábět kapsle obsahující tento bakteriální kmen pod názvem Mutaflor. [15]

Probiotika byla původně definována jako mikroorganismy, vyvolávající růst jiných mikroorganismů. [14] Později jako živé mikroorganismy, které vyvolávají nebo podporují

prospěšnou rovnováhu autochtonní mikrobiální populace gastrointestinálního traktu (GIT). Tyto mikroorganismy nemusejí být nezbytně stálou součástí GIT, ale měly by mít prospěšný vliv na celkový zdravotní stav člověka. [16, 17] Nyní se probiotika definují jako „mono nebo smíšené kultury živých mikroorganismů, které, pokud jsou podány člověku, příznivě hostitele ovlivňují zlepšením vlastností vlastní mikroflóry“. [18]

### 2.2.2. Co jsou to probiotika

Pojem „probiotikum“ je odvozené z řeckého jazyka a znamená „pro život“, je opakem slova antibiotický – „proti životu“.

Probiotika se řadí mezi funkční potraviny, což jsou potraviny, které zvyšují zdraví prospěšné mikrobiální flóry ve střevě. [19] Řadí se mezi ně zakysané mléčné výrobky s přídavkem živých bakterií mléčného kvašení, především laktobacilů, bifidobakterií a streptokoků. Tyto fermentované mléčné výrobky příznivě ovlivňují zdraví člověka tím, že zlepšují mikrobiální rovnováhu v zažívacím traktu.

Definice probiotik byla rozšířena v posledním desetiletí. V dnešní době jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy (mléčné bakterie, jiné bakterie nebo kvasinky aplikovány jako sušené buňky a nebo ve fermentovaných produktech), vykazující užitečný efekt na zdraví při užívání léků a zlepšení vlastností střevní mikroflóry. [20, 21]

### 2.2.3. Požadované vlastnosti probiotických bakterií

Mikroorganismy považované za probiotické lze rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje bakterie mléčného kvašení. Jedná se o heterogenní skupinu grampozitivních bakterií, jejichž metabolismem vzniká kyselina mléčná. Jde o bakteriální druhy ze tří rodů; *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Lactococcus*. A další rody této skupiny (např. *Enterococcus*, *Streptococcus*). Podstatné je, že ve skupině bakterií mléčného kvašení jsou zahrnuty ty bakteriální druhy, které jsou obecně považovány za bezpečné. Jejich aplikace tedy nepředstavuje pro člověka žádné riziko. Do druhé skupiny jsou zařazovány probiotické organismy, které představují nepatogenní izoláty, např. *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum* nebo kvasinku *Saccharomyces boulardii*, tj. mikrobiálních rodů, které zahrnují i potenciálně patogenní kmeny.

Probiotické mikroorganismy mají některé společné vlastnosti: jsou anaerobní, produkují organické kyseliny s antimikrobiálními vlastnostmi (kyselinu mléčnou nebo octovou), jako hlavní zdroj energie využívají sacharidy. Mají jednoznačný pozitivní vliv na lidské zdraví a stabilizují střevní mikroflóru produkcí antimikrobiálních látek. Tvorbou protilátek posilují imunitu, ale také snižují hladinu sérového cholesterolu. Působí pozitivně při osteoporóze a zvyšují vstřebatelnost vápníku. Produkují vitamíny řady B. Působí proti zubnímu kazu a vzniku žaludečních vředů. Zpomalují úbytek kostní dřeně a zlepšují průchodnost střev. Redukují tvorbu enzymů spojených se střevními problémy v těle. Všechny pozitivní účinky jsou závislé na vybraném kmeni. [22, 23]

Požadavky na probiotika

- účinnost a bezpečnost
- bez patogenních účinků
- odolnost vůči žaludeční šťávě a žluči



- schopnost adherovat na střevní epitel
- humánní původ probiotik
- přežívat výrobní proces a zůstat životaschopné po celou dobu trvanlivosti potravin

Pravděpodobné účinky:

- snižují účinek některých karcinogenních mikroorganismů
- zvyšují odolnost vůči průniku infekcí
- posilují intestinální mikroflóru při tlumení alergických reakcí
- zlepšují kvalitu života pacientů se zánětlivým onemocněním střev

Prokázané účinky:

- posílení imunity
- omezená působení patogenů ve střevech
- snížení případů recidivy povrchových nádorů močového měchýře
- zkrácení doby léčení rotavirového průjemového onemocnění
- zmírnění symptomů intolerance laktosy [13, 24]

#### **2.2.4. Vliv probiotik na zdraví**

Probiotika představují živé organismy, které jsou lidského původu a ve svých důsledcích příznivě ovlivňují zdravotní stav příjemce. Jejich účinek spočívá ve stabilizaci přítomné mikroflóry trávicího traktu. Tím se vytvářejí předpoklady pro příznivé ovlivnění zdravotního stavu člověka s cílem dosáhnout prevence určitých chorob nebo napomoci k léčbě stávajících nemocí. V současné době se nejčastěji užívají probiotika skupiny laktobacilů, bifidobakterie, některé nepatogenní kmeny *Escherichia coli* a kvasinka *Saccharomyces boulardii*. Probiotika jsou bezpečným lékem, neboť se jedná o komenzální nepatogenní mikroorganismy. [25]

Existují choroby, jejichž léčba je do určité míry ovlivnitelná účinkem probiotik. Rozsah je poněkud širší, proto problematiku rozdělují do podkapitol:

- postavení probiotik v gastroenterologii
- postavení probiotik v hepatologii
- účinek probiotik na urogenitální systém
- účinek probiotik na imunodeficientní a imunosuprimované jedince
- postavení probiotik v prevenci a terapii nádorových onemocnění
- vliv probiotik na mykotické oportunní infekce

##### **2.2.4.1. Postavení probiotik v gastroenterologii**

- terapie průjmů
- idiopatické střevní záněty
- léčba infekce *Helicobacter pylori*
- akutní pankreatitida
- syndrom dráždivého tračníku

## Vliv probiotik na terapii průjmů

### Akutní infekční průjmy (kuterokolitidy)

Normalizace bakteriální střevní mikroflóry může příznivě ovlivnit infekční průjmová onemocnění, především u dětí. Léčba probiotiky sníží dobu trvání průjmů o jeden až dva dny. Ve studiích byly podávány především laktobacily, ale v některých i bifidobakterie, saccharomycety, streptokoky eventuelně enterokoky. Podání *Lactobacillus rhamnosus* dětem do věku tří let signifikantně snížilo výskyt nozokomiálních průjmů (průjem způsobený infektem získaným v nemocnici). Podobný efekt mělo i podání *Escherichia coli Nissle* novorozencům. [26, 27, 28]

### Cestovatelské průjmy

V této indikaci jsou probiotika velmi často podávána. Většina publikovaných studií je poměrně stará a jejich výsledky jsou kontroverzní – v jedné studii byl prokázán efekt kombinace *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus bulgaris*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus thermophilus* na snížení frekvence průjmů v porovnání s placebem. Další studie s jinými probiotiky tento efekt nepotvrdily. [29, 30]

### Průjmy po antibakteriální léčbě

Příčinou je především přerůstání *Clostridium difficile* a kvasinek. Podání probiotik se v této indikaci jeví zcela racionální a empiricky se využívá již delší dobu. V publikovaných studiích, ve kterých bylo léčeno více než 2000 nemocných a probiotika byla podávána současně s antimikrobiální léčbou, potvrdily účinek tohoto postupu v prevenci průjmů navozených touto terapií. [31, 32]

### Idiopatické střevní záněty

V etiopatogenezi nespecifických zánětů střevních hraje důležitou roli rovnováha mezi prozánětlivými (bakterie v lumen střeva a antigeny bakterií a potravin) a protizánětlivými faktory (hlen, slizniční bariéra).

Ovlivnění rovnováhy prozánětlivých a protizánětlivých faktorů se děje na základě:

- genetických predispozic (v rodině se vyskytla/nevyskytla porucha této rovnováhy) - vliv na rovnováhu může být tedy pozitivní i negativní
- vlivu vnějšího prostředí (vliv životního prostředí, stravovacích návyků apod.) - vliv na rovnováhu je většinou negativní
- vlivu kompartmentů mikrobiální flóry
  - vliv na rovnováhu je pozitivní bereme-li v úvahu tzv. protektivní kompartmenty, kam patří např. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*
  - vliv na rovnováhu je negativní jedná-li se o agresivní kompartmenty, kam lze zařadit např. *Escherichia coli*
- probiotik – vliv na rovnováhu je pozitivní

Jednotlivé typy idiopatických střevních zánětů:

### **Ulcerózní kolitida**

Neboli proktokolitida je idiopatický zánět tlustého střeva (kolitida) a konečníku. Postihuje libovolnou část tlustého střeva, ale vždy konečník. Sliznice střeva je pokryta hlenem a hnisem a jsou v ní povrchové vředy. V patogenezi se uplatňují autoimunitní procesy (proti cytoskeletu epiteliálních buněk). Nemoc se projevuje bolestivým vyprazdňováním bez úlevy, krví a hlenem ve stolici, v těžších případech průjmy a celkovými příznaky (teplota, kloubními příznaky, postižením jater aj.). Onemocnění má kolísavý průběh. Zvyšuje riziko vzniku kolorektálního karcinomu. [33]

V léčbě ulcerózní kolitidy byly publikovány studie především s kmenem *Escherichia coli* Nissle. Pozitivní účinek mělo i podání preparátu VSL#3 (obsahuje tři druhy *Lactobacillus* sp., tři druhy *Bifidobacterium* sp. a *Streptococcus thermophilus*). V této indikaci by mohla být úspěšná i *Saccharomyces boulardii*. [34]

### **Crohnova choroba**

Crohnova choroba je zánětlivé onemocnění, které postihuje různé úseky střeva, často konečnou část tenkého střeva – ileum. Časté je také postižení kolon (tračníku), mohou však být postiženy prakticky jakékoli úseky trávicí trubice. Nejčastěji nemoc vzniká v mladším věku, v současné době se zvyšuje incidence. Příčina není zcela jasná, je pravděpodobný podíl imunitních mechanismů. Střevní stěna je ztlustělá a celá prostoupená zánětem. Vytvářejí se v ní vředy, píštěle, abscesy, průsvit střeva se zužuje. Mohou se vyskytovat píštěle v okolí řitního otvoru. Nemoc se projevuje průjmy, bolestmi břicha, poruchou trávení a vstřebávání, celkovými příznaky (zvýšená teplota aj.) a příznaky mimostřevními (bolestmi a záněty kloubů, stomatitidou – zánět dutiny ústní, kožními obtížemi, zánětem žlučníku, tvorbou oxalátových kamenů v ledvinách apod.). Nemoc má kolísavý průběh s obdobím klidu a aktivity. Léčebně se podávají protizánětlivé léky např. mesalazin, kortikoidy, v těžších případech imunosupresiva. [33]

Výsledky probiotické léčby nejsou jednoznačné. Snížení počtu relapsů ve skupině, kde k mesalazinu byla přidána *Saccharomyces boulardii*. [35]

### **Syndrom dráždivého tračníku.**

Pro dráždivý tračník jsou příznačné nutkavé opakované ranní defekace. Při nichž se konzistence opakovaných stolic mění od solidní až po řídkou či vodnatou (tzv. ranní debakly). Postprandiální průjem (průjem, který se dostaví po jídle) je jinou typickou formou tohoto onemocnění. V rozvinutých případech postižení vůbec nejedí, mají-li někam jít. U některých nemocných se vyskytne pouze urgentní, jen krátce zadržitelné nucení k defekaci, zejména při psychicky (nebo i fyzicky) zátěžové situaci. U některých dominuje tzv. dolní dyspeptický syndrom. Nemocní si stěžují na víceméně trvalé potíže: na plnost v břiše, pocit nadmutí, střídavé stolice, pocit nedostatečného vyprázdnění. Onemocnění probíhá intermitentně (přerušovaně), vlekle, s obdobími klidu nebo zlepšení a s fázemi zhoršení. U některých nemocných jsou obtíže prakticky stálé.

U některých nemocných může podání probiotika zlepšit klinický průběh, zejména u skupiny s hlavním příznakem průjmů. [36, 37]

### **Divertikulární choroba tračníku**

Divertikly jsou výčlipky stěny tračníku různé velikosti (několik mm až 1 - 2 cm). Jsou-li mnohočetné mluví se o divertikulose. Jsou jedním z nejčastějších patologických nálezů na tlustém střevě. Zřetelně jich přibývá s věkem. V hospodářsky vyspělých zemích kolísá výskyt od 5 % do 45 % v populaci. U 90 % těchto nemocných jsou divertikly lokalizovány v aborální části tlustého střeva. Asi u 90 % nositelů divertiklů jde o náhodný nález, divertikly nejsou zdrojem potíží - prostá divertikulosa. Jako divertikulární nemoc se označuje divertikulosa provázená zřetelnou symptomatologií, jde o projevy blízké dráždivému tračníku. Divertikulitida (zánět ve vytvořeném divertiklu) a peridivertikulitida jsou komplikace, které mohou vzniknout nejen u divertikulosy symptomatické, ale i dosud symptomaticky němé. Divertikulitida vzniká retencí stolice, dekubitálními změnami s poruchou cirkulace s následnou bakteriální invazí a mikro- nebo makroperforací střeva. Hrozí vznik píštěle, které mohou pronikat do okolních orgánů. Projevem probíhajícího zánětu je mimo jiné i krvácení ze zažívacího traktu, které je charakteristické výskytem jasně červené krve na povrchu stolice. Krvácení může být nepatrné, ale i dost masivní a může nemocného značně vyděsit. [36]

Symptomatickou nekomplikovanou divertikulární nemoc často doprovázejí bolesti a nepravidelná stolice. Zadržení střevního obsahu v divertiklech může vést ke změnám střevní mikroflóry a podání probiotik by tudíž mohlo být efektivní (*Escherichia coli Nissle*). [38]

### **Léčba infekce *Helicobacter pylori***

Kromě vředové nemoci žaludku a dvanáctníku je význam *Helicobacter pylori* intenzivně zkoumán a studován též u Crohnovy nemoci a v poslední době i u nemocných u nichž se vyskytla rosacea (lat. růžovka, zánětlivé onemocnění kůže obličeje. Vyskytuje se obvykle ve středním věku. Projevuje se zčervenáním v oblasti tváří a nosu, rozšířenými žilkami a načervenalými pupínky. Příčina není zcela známa, vliv mají některé dráždivé potraviny včetně alkoholu. Někdy je provázena záněty očí a vznikem nápadně zvětšeného červeného nosu). [33] Jelikož se *Helicobacter pylori* považuje za jednu z nejvýznamnějších příčin vzniku žaludečních vředů a případně chronické gastritidy je v zájmu lékařů eradikace helicobaktera z organismu.

#### **Klasické léčebné režimy eradikace *Helicobacter pylori***

Dnes jsou již k dispozici klasické léčebné postupy. Je to kombinace léků snižujících produkci kyseliny solné s antimikrobiálními léky, které proti *Helicobacter pylori* působí jako proti infekčnímu agens.

### **Podíl probiotik na eradikaci *Helicobacter pylori***

Velká pozornost je věnována jevu compliance pacientů. Jako compliance (angl. to comply = poddat se) se označuje dodržování léčebného režimu či jiné intervence, ochota nemocného spolupracovat při léčbě, přijmout a řídit se pokyny lékaře. [33] Probiotika, živé

mikroorganismy obsažené v potravě, ovlivňují příznivě zdravotní stav těch, kdo je požívají a sice interakcí s mikroflórou cílových osob. Jsou zkoumána právě pod zorným úhlem snah zvýšit úspěšnost eradikace *Helicobacter pylori* na straně jedné a zvýšit compliance pacientů na straně druhé. Pokud by velké skupiny obyvatelstva užívaly současně dvě antibiotika, objevuje se významná možnost vzniku mikrobiální bakteriální rezistence k těmto antibiotikům i u jiných mikrobů, než je *Helicobacter pylori*. Také nežádoucí účinky, které se při celosvětovém rozšíření eradikačních režimů objevují stále častěji, představují značný, jak medicínský a etický, tak ekonomický problém. Tyto úvahy vedly ke konceptu promyšleného užití probiotik jako součásti celostního „managementu“ infekce *Helicobacter pylori* u velkých populačních skupin.

Studie zabývající se příznivým vlivem probiotik u kolonizace *Helicobacterem pylori* se počínají objevovat kolem roku 1989. Údaje a závěry nashromážděné těmito studiemi vedly k možnosti přistoupit poté i ke studiím na člověku.

Preklinické studie vlivu probiotik na kolonizaci *Helicobacter pylori* ukazují, že supernatant kultury laktobacilů snižuje životaschopnost helicobakterů, snižuje u nich produkci ureasy, kterou nezbytně potřebují k přežití v kyselém prostředí žaludku a zabraňuje vzniku histopatologických lézí sliznice. Můžeme tedy považovat za prokázané, že *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus casei-rhamnusus* a *Lactococcus salivarius* inhibuje růst *Helicobacter pylori* in vitro.

Klinická studie vlivu probiotik na kolonizaci *Helicobacter pylori* prokázala, že význam probiotik je ve snížení přítomnosti a životaschopnosti *Helicobacter pylori*, který vytváří podhoubí pro vředovou chorobu žaludku a dvanáctníku a je rizikovým faktorem pro nádorové onemocnění žaludku. [39]

### **Akutní pankreatitida**

Akutní pankreatitida je náhle vzniklé, prudce a těžce probíhající onemocnění s výraznou bolestí břicha, zvracením, horečkou až vznikem šoku. Někdy vzniká v souvislosti se žlučovými kamínky, může být vyprovokována těžkou dietetickou chybou, alkoholem nebo některými celkovými onemocněními (např. hyperparatyreosa = zvýšená hladina parathormonu v krvi). Těžká forma vede k nekrose pankreatu. Je to velmi závažný, život ohrožující stav, který si vyžaduje intenzivní léčbu. [33]

Infekce je jednou ze zásadních komplikací, které hrají roli v prognose akutní pankreatitidy. [40] První studie ukazují, že by probiotika ovlivněním bakteriální střevní translokace mohla incidenci infekcí snížit – podání enterální výživy spolu s *Lactobacillus sp.* tento efekt mělo. [39]

#### **2.2.4.2. Postavení probiotik v hepatologii**

### **Jaterní encefalopatie**

Při jaterní encefalopatii se dostavují neurologické a psychiatrické projevy poškození mozku při jaterním selhávání. Má poměrně různorodé projevy vyjádřené s různou intenzitou (akutní, chronická). Způsob, jakým vede jaterní selhávání k jaterní encefalopatii není ještě zcela objasněn, nejuznávanější teorie předpokládá, že je koma, které může vzniknout, způsobeno poruchou metabolismu dusíku. Amoniak a ostatní puriny jsou v játrech metabolicky

zpracovávají na močovinu. Pokud játra nefungují, dostávají se do systémového oběhu a dosud neznámým mechanismem působí toxicky na mozek. [33]

Dominantní postavení v léčbě jaterní encefalopatie mají v současné době laktulosa a nevstřebatelná antibiotika. Jedním z mechanismů účinků laktulosity může být i prebiotický efekt pro laktobacily, které snižují aktivitu bakteriálních ureas, což může vést k poklesu hyperamonémie. V pilotní studii na 97 nemocných byl prokázán příznivý efekt synbiotika na minimální jaterní encefalopatii (MJE) – došlo ke snížení hladiny amoniaku i ke zlepšení projevů MJE. [41] V léčbě klinicky rozvinuté jaterní encefalopatie byl v jedné studii popsán i příznivý efekt *Enterococcus faecium*, po jehož podání se zlepšil klinický stav EEG (elektroencefalograf) nálezu a snížila se hladina amoniaku. [42]

### **Chronické onemocnění jater (cirhóza)**

U 50 – 70 % nemocných s jaterní cirhózou dojde v tenkém střevě k mikrobiálnímu přerůstání v důsledku kontaminace gramnegativní kolonickou mikroflórou. Obecně jsou infekce u jaterní cirhózy velmi časté a mohou se podílet na řadě komplikací s chorobou spojených. Podání synbiotika snížilo endotoxémii, která je ukazatelem stupně translokace. [43] Snížení endotoxémie se dosáhne podáváním *Escherichia coli Nissle* po dobu 42 dnů. [44] Lze předpokládat příznivý vliv na prevenci závažných infekčních komplikací, především spontánní bakteriální peritonitidy. Obnova fyziologické mikroflóry v trávicím traktu sníží zátěž jater potenciálními vstřebanými toxickými metabolity, především endotoxinem. [45]

### **Nealkoholická steatohepatitida**

Je v poslední době velmi studovanou chorobou, neboť je relativně častá a může vést až k rozvoji jaterní cirhózy. Léčba doposud není jasná a probiotika by mohla hrát důležitou roli. Klinické studie v této oblasti zatím chybějí, ale ve dvou laboratorních studiích již byl příznivý vliv probiotik popsán. [46]

#### **2.2.4.3. Účinek probiotik na urogenitální systém**

##### **Laktobacily v profylaxi vaginálních kandidóz**

Laktobacily jsou součástí střevní mikroflóry, ale rovněž vytvářejí přirozenou vaginální mikroflóru. Jejich nedostatek může vést ke kaskádě změn, jejíž výsledkem je vaginitida. Relapsy jsou spojeny s neúspěšnou snahou vytvořit vaginální flóru, ve které by dominovaly laktobacily. U zdravé ženy existuje rovnováha mezi kvasinkami a vaginálními obrannými mechanismy, které kontrolují a omezují růst kvasinek. Laktobacily tvoří jakousi bariéru chránící vaginu před kolonizací patogeny. [47, 48]

Ne všechny kmeny rodu *Lactobacillus* jsou účinné proti kandidosám. Účinnost proti kvasinkám se posuzuje podle několika kritérií – schopnost adheze k lidským epiteliálním buňkám, produkce peroxidu vodíku, kongregace s patogeny a antimikrobiální aktivita proti *Gardnerella vaginalis* a *Candida albicans*. *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, protože adherují na epiteliální buňky a tím vytěsňují vaginální patogeny, produkují vysokou hladinu peroxidu vodíku, koagregují s patogeny a inhibují růst

*Gardnerella vaginalis*. [49] Zdá se, že denní užití orální formy nebo použití vaginálních čípků 1 - 3x týdně s kmeny *Lactobacillus rhamnosus*, nebo *Lactobacillus fermentum* zabraňuje růstu patogenů v urogenitálním traktu a snižuje riziko vzniku infekcí močových cest a v pochvě. Studie s *Lactobacillus plantarum* ukazují, že jeho užití významně snižuje výskyt infekcí u pacientů, kteří podstoupili velké chirurgické operace. [50] Prevence vzniku kandidosy spočívá mimo jiné v omezení příjmu cukrů. Infekce způsobené probiotickými kmeny se vyskytují extrémně málo a zatím popsané případy se týkají dospělých. Případy této infekce jsou popisovány zejména u imunosupresivních pacientů (dospělých i dětí).

#### **2.2.4.4. Účinek probiotik na imunodeficientní a imunosuprimované jedince**

O imunodeficientních nemocných se hovoří v souvislosti s AIDS a hojně i nádorovými onemocněními. Imunosuprimovaní jsou obecně lidé v transplantačních programech. Souhrnně lze říci, že u imunokompromitovaných pacientů dochází k syndromu bakteriálního přerůstání v trávicím traktu, čímž vzniká oportunní infekce se systémovou zánětlivou odpovědí. To se projeví vznikem virových gastroenteritid, herpetických a cytomegalovirových kolitid, parazitárních infekcí a kandidové infekce. [37]

#### **2.2.4.5. Postavení probiotik v prevenci a terapii nádorových onemocnění**

V mnoha studiích na zvířecích modelech bylo prokázáno, že probiotika brání vzniku a růstu prekarinogenních lézí a nádorů. Ojedinelé studie to nepotvrdily, což mohlo být důsledkem malé dávky probiotik, či doby podávání probiotika [51]. Některé z novějších studií ukázaly, že určité směsi metabolitů izolované z fermentovaného mléka mají vyšší potenciál deaktivovat etiologicky rizikové faktory kolorektálního karcinomu, než buněčné složky mikroorganismů. [52]

Jedním z mechanismů působení probiotik je detoxikace genotoxinů ve střevě. [53] Řada klinických pracovišť po uveřejnění výsledků z preklinického výzkumu studovala účinky probiotik přímo na lidských dobrovolnících. Hnilobné bakterie jsou dnes považovány za jeden z rizikových faktorů kolorektální karcinogeneze. Více studií prokázalo, že bifidobakterie nebo laktobacily potlačují jejich růst a množení a touto cestou mohou snížit produkci nádorových promotorů a prekarinogenů. Tuk v potravě je považován za rizikový faktor, neboť při jeho konzumaci dochází ke zvýšení hladiny žlučových kyselin v tlustém střevě. Bylo prokázáno, že šestitýdenní podávání bakterií *Lactobacillus acidophilus* pacientům s kolorektální karcinogenezí vedlo ke snížení koncentrací rozpustných žlučových kyselin ve stolici. [54]

#### **2.2.4.6. Vliv probiotik na mykotické oportunní infekce**

Mykotické oportunní infekce patří k nejzávažnějším a život ohrožujícím stavům. Léčba spočívá v antibiotické léčbě spojené s farmakoterapií základního onemocnění a antimykotické léčbě s následnými opatřeními, které navozují profylaxi. Lze doporučit potraviny s vysokým obsahem vlákniny, důležité je také podávání probiotik a prebiotik. [37]

### 2.2.5. Prebiotika, vláknina, synbiotika

Nezbytnou podmínkou existence střevní mikroflóry je přítomnost tzv. **prebiotik**. Jsou to nestravitelné potravinové doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele tím, že selektivně podporují růst a/nebo aktivitu jednoho nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě. [55] Všechna průmyslově používaná prebiotika jsou sacharidy, převážně oligosacharidy, např. frukto-oligosacharidy nebo některé polysacharidy, které stimulují růst bakterií *Bifidobacterium* a/nebo *Lactobacillus*.

Prebiotika jsou nestravitelná stejně jako dietní vláknina, ale jejich fyziologické funkce se často liší. Prebiotika totiž stimulují růst bakterií velmi selektivně a zároveň potlačují růst mnoha patogenních bakterií přítomných ve střevech. Tyto patogeny dokážou využít prebiotika jen v omezeném množství, anebo vůbec ne.

Prebiotika jsou tedy schopna selektivně podporovat růst takových střevních mikroorganismů, které je dokáží rozštěpit (hydrolyzovat) na monomery a využít pro svůj růst. Většina v současnosti využívaných prebiotik se vyskytuje jako přirozená složka v zelenině a mnoho z nich je již dnes komerčně dostupných a využívají se jako přísady do funkčních potravin. [36, 55, 56]

U člověka patří k prebiotikům zejména různé formy vlákniny. **Vláknina** je definována, jako složka potravy, především rostlinného původu, která není rozkládána enzymy trávicího traktu. Nejedná se o jednu látku, nýbrž o chemicky značně rozsáhlou skupinu, která se dělí na vlákninu rozpustnou (necelulosové a jiné polysacharidy, pektin, hemicelulosa) a nerozpustnou (lignin). Vláknina se podílí na rychlejší průchodu tráveniny střevem, na hmotnosti a konzistenci stolice.

Pojmem **synbiotika** se označuje směs probiotik a prebiotik. Tyto společně modelují střevní mikroflóru ve prospěch hostitele od jeho narození. Doporučují se k úpravě dyspepsie vzniklé v důsledku průjmu či po terapii širokospektrými antibiotiky, které výrazným způsobem ovlivňují složení bakterií ve střevech. Některé výrobky na trhu již obsahují jak probiotickou, tak prebiotickou složku. [36, 57, 58]

### 2.3. Možnost použití mléčných bakterií jako probiotik

Jako probiotika, která lze přidávat do potravin jsou komerčně dostupné pouze některé kmeny *Lactobacillus*-, *Bifidobacterium*- a *Enterococcus*, lze však využívat i další druhy (např. *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*). K probiotickým mikroorganismům se zařazují i kvasinky (*Saccharomyces boulardii*) a nepatogenní *Escherichia coli* kmene Nissle 1917. [59, 60]

Aby mohl být bakteriální kmen využíván jako probiotikum, musí splňovat následující požadavky:

- musí být zdravotně nezávadný (např. lidského původu a nepatogenní)
- musí být natolik rezistentní, aby se nepoškodil v průběhu technologického zpracování a neměl by ovlivňovat organoleptické vlastnosti probiotické potravin
- musí projít bez poškození gastrointestinálním traktem (odolnost vůči žaludeční kyselině a žluči)
- přichycuje se na epitelální buňky ve střevech a je schopen dalšího růstu
- má pozitivní vliv na lidské zdraví



Fermentací upravené potraviny jsou dnes považovány za nedílnou součást lidských dietních zvyků. Hlavními surovinami zpracovávanými při komerční fermentaci jsou mléko, maso, okurky a zelí. To dává možnost vzniku více než 400 druhům odlišných typů sýrů a velmi široké paletě jogurtů, mléčných nápojů, klobás a salámů, zelenině ve sklenicích a kyselému zelí. Evropský trh s probiotickými potravinami stále roste, obrát je odhadován na miliardu EUR ročně, přičemž asi 60 % tvoří mléčné výrobky. [59, 61]

### 2.3.1. Fermentované potraviny

#### Fermentované mléčné produkty

Podle Vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb. se jako fermentovaný mléčný výrobek označuje výrobek, který je získán kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsí za použití mikroorganismů mléčného kysání, tepelně neošetřený po kysacím procesu. Tato vyhláška též stanovuje pro jednotlivé skupiny kysaných mléčných výrobků množství bakterií použité mikrobiální kultury.

Mezi kysané mléčné výrobky patří: jogurt (nízkotučný nebo odtučněný, se sníženým obsahem tuku, smetanový), jogurtové mléko, acidofilní mléko, kefír, keřírové mléko, kysané mléko nebo smetanový zákys, kysaná nebo zakysaná smetana, kysané podmásli, kysané mléčné výrobky s bifidokulturou. [62]

Pro výrobu tradičních fermentovaných mlék jsou mikroorganismy vybírány na základě schopnosti růst a produkovat organické kyseliny v mléce a vlastností ovlivňujících rheologické a organoleptické vlastnosti výrobku. V případě probiotických produktů je výběr prováděn na základě prokázaných a potenciálních pozitivních efektů na organismus člověka, nicméně mikroorganismus nesmí negativně ovlivňovat vlastnosti konečného produktu.

Z probiotických bakterií se nejvíce používají bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. [59]

Sharareh Hekmat a Gregor Reid (2006) porovnávali organoleptické vlastnosti běžného jogurtu s probiotickým. Výsledky ukázaly, že vzhled, chuť, textura a celková kvalita probiotických jogurtů (s 1% tuku), byly srovnatelné se standardním jogurtem (1% tuku). Toto zjištění je důležité, protože doplnění některých bakterií mléčného kvašení může zkazit mléko i jogurt a vést k nepříjemné chuti a zápachu. [63]

#### Fermentované masné výrobky

Původ fermentovaných salámů a sušených fermentovaných masných výrobků je prokázán před více než 2000 lety, v oblasti Středomoří. V dnešní době tyto výrobky zdomácněly téměř v celém světě.

Při fermentační fázi výroby působí bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus acidilactici*, případně *Micrococcus*) rychlý a důrazný pokles pH. Vzniklá kyselina mléčná zabrání přítomnosti jiných, nevhodných, bakterií a zajistí vznik a udržení charakteristické červené barvy. Fermentace může proběhnout jak pod vlivem přírodně se vyskytujících bakterií, tak pod vlivem úmyslně přidaných „startovacích“ kultur (což jsou komerční preparáty obsahující živé mikroorganismy, které v potravíně vyvíjejí požadovanou metabolickou aktivitu) mikroorganismů.

Pro nutraceutický význam ušlechtilých fermentovaných suchých salámů (u nás salámy tzv. „uherského typu“) je důležité, že obsahují jak probiotika, tak prebiotika, což je z hlediska zdravotní prospěšnosti fermentovaných potravin nejvýhodnější.

Salámy uherského typu obsahují v 1 gramu až  $10^7$  KTJ (kolonie tvořící jednotku), tedy  $10^7$  prospěšných mikroorganismů typu *Lactobacillus plantarum*, a též kolem  $10^7$  KTJ dalších prospěšných mikroorganismů typu *Lactobacillus sakei/curvatus* a případně stejné množství *Lactobacillus versmoldensis*, což je nově objevený rod laktobacila, který byl popsán v roce 2002 Rodriguezem a spol., jako typický pro fermentované masné produkty. Při použití plísni a kvasinek dominují kmeny *Debarymyces hansenii*, *Candida tamara*, *Penicilium nalgiovense*, resp. *chrysogenum*. Použití iniciálních kultur zajistí dobrou kvalitu a nezávadnost výrobku. [5, 64]

### **Zeleninové produkty**

V Evropě je na trhu mnoho různých typů fermentované zeleniny, zeleninových šťáv a směsí, ekonomicky nejvýznamnější je fermentace oliv, okurek a zelí. Syrová zelenina má vysoký obsah mikroorganismů, a protože nemůže být pasterována aniž by došlo k výraznému zhoršení kvality, je fermentace vhodným způsobem konzervace.

Materiál pro fermentaci je nejčastěji pasterizovaná zeleninová drť nebo šťáva, jako startovací kultury se nejčastěji používají *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* a *Leuconostoc mesenteroides*. [5]

### **Zmrzlina a mražené dezerty**

Probiotické kmeny rodu *Lactobacillus* (zejména *L. acidophilus*, *L. agilis* a *L. rhamnosus*) a *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium lactis*) byly použity ve výrobě zmrzliny a mražených krémů. Jejich důležitým faktorem je přežití zmrazení a skladování v chladu.

Kultury mohou být přidány dvěma způsoby. Buď přímo, zamícháním probiotika do zmrzliny ještě před zmrazením anebo pomocí pasterovaného mléka, jako substrátu pro fermentaci před smícháním se zmrzlinou.

Byly provedeny studie s přidavkem sacharosy, aspartamu a inulinu ve zmrzlině na vliv probiotických mikroorganismů. V prvních dvou případech byla zmrzlina uchována 6 měsíců při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a během skladování byly sledovány chuťové a strukturní vlastnosti. Bylo zjištěno, že množství mikroorganismů v produktu zůstalo nezměněno, tedy že nezáleží na tom, zda je k výrobě použit aspartam nebo sacharosa, což umožňuje výrobu zmrzliny jako zdroj probiotika pro lidi nemocné diabetem. [65]

Při studiu s inulinem byl vzorek skladován při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  90 dnů. Byl zjištěn větší nárůst probiotických bakterií, tedy že inulin stimuluje růst *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium lactis* [66]

Shah a Ravula (2000) uvádí, že přežití probiotických bakterií ve fermentovaných mražených dezertech se zlepšilo zapouzdřením. Studie ukazuje, že zapouzdření může výrazně zlepšit přežití probiotických bakterií ve zmrzlině. Počet životaschopných probiotických bakterií ve všech typech zmrzlin se pohybovaly mezi  $10^8$  a  $10^9$  KTJ/g, na konci tří měsíců skladování, což je považováno za běžnou trvanlivost zmrzliny. [67, 68]

## Potenciálně probiotická a synbiotická čokoládová pěna

Provzdušněné mléčné dezerty ukázaly velký tržní potenciál, proto se začínají rozvíjet studie o přidávku probiotických bakterií do čokoládových pěn.

Pěna se vyrábí klasickým způsobem, kdy se smíchají veškeré ingredience, kromě emulgačního činidla. Po ochlazení na danou teplotu se přidá *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, směs se homogenizuje, přidá se emulgační činidlo a po ochlazení se do směsi začlení vzduch (objem se zdvojnásobí) a pěna se nechá ztuhnout v plastových kelímcích. Výrobek se uchovává při  $4 \pm 1$  °C po dobu 28 dnů. Takto připravená čokoládová pěna byla testována na životaschopnost probiotických bakterií kolektivem autorů (Lina Casale Aragon-Alegroa a kol. 2006). Studií bylo zjištěno, že životaschopnost *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* se mírně zvýšila (během 21 dnů, při 5 °C), takže čokoládová pěna se ukázala jako výborný prostředek pro začlenění tohoto probiotického kmene. [69]

### 2.3.2. Bakterie využitelné jako probiotika

Do probiotických potravin se nejčastěji používají mléčné bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

#### 2.3.2.1. Rod *Lactobacillus*

Název je odvozen z latinského slova lac = mléko. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou nesporelující, grampozitivní, nepohyblivé tyčinky, často seskupené do řetízků. Laktobacily jsou katalasa negativní a z hlediska nároku na kyslík, jsou považovány za mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní. Mohou se množit i v kultivačním prostředí s hodnotou pH 5. Jestliže však pH klesne pod 4, růst většiny laktobacilů se zastavuje.

Náleží sem druhy bakterií, které tvoří část přirozené mikroflóry úst člověka, gastrointestinálního traktu a vaginy.

Nutriční požadavky jsou složité a optimální rychlost růstu se získá pouze v médiích, které obsahují zkvasitelný substrát a odpovídající růstové faktory, např. MRS bujón.

Laktobacily mají schopnost zkvašovat cukry včetně laktosy. Heterofermentativní druhy laktobacilů produkují kromě kyseliny mléčné v menším množství ještě např. kyselinu octovou a mravenčí, také ethanol a oxid uhličitý. Druhové určování laktobacilů se provádí pomocí vhodných biochemických testů.

Orla-Jensen (1943) rozdělil laktobacily na základě homofermentativního a heterofermentativního kvašení a optimální teploty do tří skupin.

**I. skupina** – *Thermobacterium*: homofermentativní, vysoká optimální teplota

Druhy: *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. farciminis*, *L. yamanashiensis*.

Výskyt a význam: mléko a mléčné produkty, v rostlinném materiálu fermentovaném při vyšších teplotách (40 – 53 °C), v dutině ústní a intestinálním traktu lidí a zvířat, v masových produktech, pekárenský průmysl, jablečný mošt a víno, hroznový mošt, acidofilní mléka, tvaroh, sýry.

Rostou při 45 °C, nerostou při 15 °C, optimální teplota 30 až 45 °C, výjimku tvoří *L. farciminis* a *L. yamanashiensis*, které rostou při 15 °C a nerostou při 45 °C. Optimální pH 5,5 až 6,2, minimum je 3,6.

## **II. skupina** – Streptobacterium: homofermentativní, nízká optimální teplota

Druhy: všechny streptobaktérie a *L. casei subsp. casei*, *L. casei subsp. pseudoplantarum*, *L. casei subsp. tolerans*, *L. plantarum*, *L. sake*, *L. alimentarius* a další.

Rostou při 15 °C, výjimečně rostou při 45 °C, optimální teplota je 28 až 32 °C.

Výskyt a význam: mléko, sýry, mléčné a masové produkty, pekárenský kvas, kysaná kapusta a jiná zelenina a plody, dutina ústní a intestinální trakt.

## **III. skupina** – Betabacterium: heterofermentativní

Plynotvorné laktobacily nazývané betabakterie, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. bifermatas*, *L. confusus* (nově *Weissella confusa*), *L. divergens* (nově *Carnobacterium divergens*), *L. fructivorans*, *L. halotolerans* (nově *Weissella halotolerans*), *L. candleri*, *L. kefir*, *L. reuteri*, *L. sanfrancisco*, *L. viridescens* (nově *Weissella viridescens*).

Rostou převážně při 15 °C, optimální teplota 28 až 32 °C.

Výskyt a význam: mléko a mléčné výrobky, masové produkty (vakuově balené), fermentovaná zelenina a plody, pekárenský kvas, kvasnice, dutina ústní, intestinální trakt. Účastní se kažení potravin. Některé druhy laktobacilů produkují bakteriociny, např. *L. acidophilus* Lactocin B.

[1, 8, 70, 71]

Celkem 29 kmenů rodu *Lactobacillus* bylo zkoumáno in vitro pro jejich probiotický potenciál. Pouze několik kmenů bylo schopných přežít v pH 1 nebo v přítomnosti pepsinu, přičemž všechny byly ovlivněny pH 3, pankreatinem a žlučovými solemi. Žádný z nich nebyl hemolytický, většina kmenů byla rezistentních k vankomycinu a teicoplaminu a citlivých na chloramfenikol a tetracyklin. Byly nalezeny tři kmeny, in vitro (*L. casei* Shirota ACA-DC 6002, *L. plantarum* ACA-DC 146 a *L. paracasei subsp. tolerans* ACA-DC 4037), které mají vhodné probiotické vlastnosti. [72]



Obr. 3. *Lactobacillus acidophilus* [8]

### 2.3.2.2. Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* patří do čeledi *Actinomycetaceae*. Byl poprvé izolovaný a popsán v letech 1899 - 1900 panem Tissierem. *Bifidobakterie* jsou rody charakterizované jako velmi nepravidelné, často se větvící, grampozitivní anaeroby. Tvoří delší a kratší tyčinky, které jsou nepohyblivé, katalasa negativní a nesporelující. Jsou heterofermentativní, ale tvoří pouze kyselinu octovou a kyselinu mléčnou v poměru 3:2. Tento poměr je terapeuticky významný tím, že kyselina octová má větší antagonistický účinek vůči patogenním gramnegativním bakteriím.

Růstové optimum je 37 až 41 °C, rozpětí 25 až 45 °C, optimální pH je 6,5 až 7,0, nerostou při 4,5 a 8,0. Některé druhy tolerují přítomnost kyslíku v prostředí za přítomnosti CO<sub>2</sub> a v mléku, když rostou spolu s jejich přirozeným střevním partnerem *Lactobacillus acidophilus*. (Obr. 3.)

V současné době je známo 30 druhů rodu *Bifidobacterium* (pocházející z lidského zdroje, z živočišného střevního traktu nebo bchoru, z odpadní vody a fermentovaného mléka). Patří k běžné flóře dutiny ústní a zažívacího traktu, jako patogenní pro člověka byl usvědčen pouze druh *Bifidobacterium dentium*.

Vhodné kmeny bifidobakterií se užívají v mlékárenství v kombinaci s dalšími bakteriemi mléčného kvašení při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Také tvoří přirozenou komponentu střevní mikroflóry savců včetně člověka a pomocí vytvořených metabolitů se ve značné míře podílejí na potlačování nežádoucí mikroflóry v jejich trávicím ústrojí. Jako probiotické kultury se používají nejčastěji rody *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium thermophilum*. [1, 8, 21, 23, 71]

### 2.3.3. Faktory ovlivňující množství probiotik ve fermentovaném výrobku

- kombinace probiotických kmenů a tradičních zákysových kultur
- složení fermentačního média
- množství rozpuštěného kyslíku
- velikost inokula
- inkubační teplota
- vysoká kyselost a akumulace D (-) kyseliny mléčné
- nízká skladovací teplota

[59]

### Životaschopnost bakterií *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*

Miguel Gueimonde a kol. (2004) hodnotili komerční kvašená mléka na přítomnost a životaschopnost probiotických bifidobakterií a laktobacilů. Zjistili, že počty *Lactobacillus subsp.* byly vždy vyšší, naproti tomu počty bifidobakterií vždy klesly.

Podobné stanovení prováděla i řada dalších autorů, např. Dave & Shah, 1997; Gilliland, Reilly, Kim, & Kim, 2002; Medina & Jordano, 1994. Výsledky jednotlivých autorů se mírně lišily, což lze přičíst rozdílům mezi testovanými kmeny a vlivu faktorů (např. kyselost, pH, kyslík atp.). [73]

#### **2.3.4. Průmyslové použití probiotických bakterií**

Hlavní technologické požadavky pro probiotické bakterie jsou: přežít sušení, popřípadě lyofilizaci a být přítomny v aktivní formě a v dostatečném množství ve fermentovaném výrobku v době konzumace. [74] Při průmyslovém použití probiotických bakterií se používá koncentrovaných zmrazených nebo lyofilizovaných kyselých kultur. Způsob jejich aplikace se může lišit od aplikace tradičních kultur.

Používají se například následující postupy:

- a) Oddělená kultivace kyslíků tradičních a probiotických kultur. Probiotická kultura je kultivována v odděleném provozním kyslíčném za použití vhodné teploty a upraveného kultivačního média. Kultury jsou smíchány v požadovaném poměru ve fermentačním tanku.
- b) Oddělená fermentace mléka. V tomto případě je mléko fermentováno různými kyselými kulturami a vzniklé koaguláty jsou smíchány za vzniku výsledného produktu. Používá se při výrazně odlišných teplotách kultivace, např. u probiotické kultury a mezofilní kultury.
- c) Zahájení fermentace probiotickou kulturou, následované přidáním rychle prokysávající kultury.
- d) Fermentace mléka tradiční kulturou následovaná přidáním koncentrované kultury před balením.
- e) Výroba sladkého probiotického mléka. V tomto případě je koncentrovaná probiotická kultura přidána do pasterovaného mléka, při nízké teplotě, aby vůbec neproběhla fermentace a při této teplotě je výrobek uchováván až do doby konzumace. [59]

### **2.4. Možnost stanovení mléčných bakterií v potravinách**

#### **2.4.1. Metody identifikace bifidobakterií a laktobacilů**

V současné době se pro studium bakterií mléčného kvašení používají tyto metody:

##### **a) Genotypové metody**

- PCR
  - PCR se specifickými primery
  - RFLP (restriction fragment length polymorphism)
  - AFLP (amplified fragment length polymorphism)
  - RAPD (random amplification of polymorphic DNA)
  - Rep – PCR (röntgen equivalent physical)
- PFGE (Pulsed field gel electrophoresis)
- Ribotypizace
- Hybridizace se sondami
- Sekvencování
- Fluorescenční hybridizace in situ (FISH)
- Analýza plazmidové DNA

#### b) Fenotypové identifikační metody

- Morfologická analýza
- Fyziologická analýza
- Biochemická charakterizace
- Proteinový profil (SDS-PAGE)

[75]

#### **Genotypové metody**

Jsou nezávislé na kultivaci mikroorganismu. Jsou založeny na studiu DNA (popř. RNA), která je nejprve extrahována, izolována a následně purifikována. Pomocí primární struktury, která je typická pro určitý druh, je identifikován daný mikroorganismus. Metody jsou rychlé a poskytují správné rozlišení několika druhů. [76]

#### **PCR a metody založené na PCR**

**PCR** – polymerasová řetězová reakce – je metoda, díky které lze mnohonásobně naklonovat požadovaný úsek DNA. K syntéze nového vlákna DNA se používá nejčastěji termostabilní DNA polymerasa bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymerasa. PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, které je zkonstruováno tak, aby dokázalo během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia.

Daná směs se nanese na agarosový nebo polyakrylamidový gel a podrobí se elektroforéze.

Elektroforéza je separační metoda, jejímž principem je dělení látek pomocí jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli.

#### **RAPD**

Náhodná amplifikace polymorfní DNA. K amplifikaci se používají krátké primery s arbitrární sekvencí, bylo popsáno použití primerů o délce 5 - 25 bp.

#### **Fluorescenční hybridizace in situ (FISH)**

Tato technika umožňuje detekovat sekvence nukleových kyselin v cytologických preparátech chromosomů, buněk, řezech tkání a stanovit jejich prostorovou lokalizaci. Nejvíce se používá chemické značení sond s různými způsoby detekce. U fluorescenčně značené protilátky se vizualizace navázaných sond provádí ve fluorescenčním mikroskopu.

[77]

#### **Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)**

Patří mezi nejpoužívanější metody pro diferenciaci bakterií na úrovni kmene.

#### **Ribotypizace**

Metoda užívaná k typizaci bakterií. Je založena na základě srovnání fragmentů genů pro rRNA.

#### **DNA-DNA hybridizace**

Významnou metodou je hybridizace získaných fragmentů DNA s jinou molekulou DNA - komplementární a značenou sondou. Hybridizace se provádí na pevných nosičích, na kterých je polynukleotid vázán a je současně schopen hybridizace, přestože kinetika této reakce je pomalá a relativně málo efektivní. Mezi varianty hybridizace na pevném nosiči patří dot-,

blot- a slot- hybridizace, Southernův přenos, hybridizace RNA (northern blotting) a hybridizace in situ.

**Sekvencování** je stanovení primární sekvence nukleotidů v molekule genomové DNA. [75, 78, 79]

Sampo J. Lahtinen a kolektiv srovnávali metody na stanovení životaschopnosti bifidobakterií ve fermentovaných potravinách. Výsledky ukázaly, že metoda FISH a RT-PCR mají porovnatelné výsledky, ale výsledky získané komerční metodou LIVE/DEADS BacLight<sup>TM</sup> bakteriální test životaschopnosti, jsou odlišné. Kolektiv tedy došel k závěru, že výběr metody pro stanovení obsahu probiotických bakterií může mít významný vliv na výsledky analýzy. [80]

Reuter a kolektiv porovnávali probiotické potraviny z obchodních sítí s referenčními kmeny ze sbírky kultur. Fenotypová kritéria odhalila skupiny izolátů na úrovni rodu a ve většině případů správné určení druhu. Avšak pro konkrétní charakterizaci druhu a rozlišení speciálních kmenů, byly použity molekulárně založené metody. Dobré výsledky byly získány pomocí SDS-PAGE, RAPD-PCR a dot blot hybridizace s použitím genových sond. [75]

### **Fenotypové metody**

Fenotypové identifikační metody se používají ke stanovení druhu, biotypu a určitých kmenů v rámci druhu. [75] Při určování neznámého izolátu z mléčného výrobku je velmi častým krokem kultivace. Pro detekci laktobacilů existuje několik kultivačních médií, MRS agar, Rogosa, Acetate agar, MRS bujón, Rogosa agar Modified nebo selektivní půda LAMVAB (*Lactobacillus anaerobic* MRS s vancomycinem a bromocresol green). Mezi nejvíce používané patří neselektivní MRS médium (de Man, Rogosa a Sharp), které je doporučené směsicí ISO. [70, 81, 82] Pro detekci bifidobakterií se používá obnovené mléko s kvasničným autolýzátem, TPY (modifikován mupirocinem), MRS s dicloxacilinem a L-cysteinem, BSM (bifidus selektivní agar). [70, 83, 84]

Obvyklým krokem po kultivaci jsou metody popisující morfologii buněk, fyziologické vlastnosti a biochemické charakteristiky (produkce izomerů kyseliny mléčné, způsob fermentace sacharidů atp.). Nevýhodou fenotypových metod je, že jsou nedostačující pro identifikaci blízce příbuzných druhů (např. skupiny *Lactobacillus acidophilus*) a někdy nespolehlivé z důvodu adaptivních změn na podmínkách růstu. [70, 72, 76, 81, 82]

### **Plotnová metoda**

Plotnová metoda patří do kultivačních, přímých metod pro zjišťování počtu buněk. Jejím principem je počítání vyrostlých kolonií (tzv. KTJ) na živném médiu, které je buď v Petriho misce anebo ve zkumavce.

### **Podmínky kultivace**

*Bifidobacterium bifidum*

Optimální teplota 37 - 40 °C, doba kultivace 16 až 20 h, doporučená kultivační média: obnovené mléko s kvasničným autolýzátem, TPY, MRS s dicloxacilinem a L-cysteinem.



*Lactobacillus acidophilus*

Optimální teplota 37 °C, doba kultivace 16 h, doporučená kultivační média: obnovené mléko, MRS, syrovátkový agar.

*Lactobacillus casei subsp. casei*

Odstředěné mléko, MRS, 30 °C, 48 h, srážení nastává za 28 – 30 h růstu, 30 °C, 16 – 18 h aerobně.

*Lactobacillus casei var. rhamnosus*

Odstředěné mléko s 0,5 % kvasničného autolýzátu, MRS, 30 °C, 16 – 18 h aerobně.

*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

MRS, 37 – 45 °C, 16 – 20 h v bujonu, 3 - 5 dní v agaru, aerobně i anaerobně.

*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*

Optimální teplota 37 – 40 °C, doba kultivace 16 až 24 h, doporučená kultivační média: obnovené mléko, MRS.

*Lactobacillus plantarum*

Optimální teplota 30 °C, doba kultivace 18 h, doporučená kultivační média: obnovené mléko, MRS.

*Lactobacillus rhamnosus*

Optimální teplota 37 °C, doba kultivace 18 h, doporučená kultivační média: obnovené mléko, MRS.

*Lactobacillus sake*

Odstředěné mléko s 0,5 % kvasničného autolýzátu, MRS, 37 °C, 16 – 18 h, aerobně.

*Lactobacillus salivarius subsp. salicinus*

Odstředěné mléko s 0,5 % kvasničného autolýzátu, MRS, 37 °C, 16 – 18 h, aerobně.

*Lactococcus lactis subsp. lactis*

Optimální teplota 30 °C, doba kultivace 18 h, doporučená kultivační média: obnovené mléko. [85]

## 2.5. Zhodnocení nabídky probiotických potravin v ČR

Za probiotické jsou považovány potraviny obsahující dostatečné množství specifických živých probiotických organismů. Probiotika můžeme přijímat v různých formách: jako zakysané mléčné výrobky, potravinové doplňky prodávané v lékárnách či některých obchodech, ale i v kojenecké výživě.

Probiotické potraviny na našem trhu neustále přibývají, největší výběr poskytují výrobky mléčné. V dnešní době je celá řada firem (společností) vyrábějící kysané mléčné výrobky s obsahem probiotik.

### 2.5.1. Potravinové doplňky v potravinách

- **Danone a.s. (Benešov)**

Mezi nejznámější výrobky patří Actimel. (Obr. 4.)

Actimel je probiotický mléčný výrobek, který obsahuje tři různé živé kultury: kultury *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*, které jsou obsaženy i v běžných jogurtech a unikátní kulturu *Lactobacillus casei Imunitass®*, což je specifická probiotická kultura, kterou neobsahuje žádný jiný výrobek kromě Actimelu. [86]

Actimel se vyrábí v 7 různých variantách (bílý, bílý slazený náhradními sladidly s 0,1 % tuku, jahodový, malina / brusinka, lesní plody, multifruit)



Obr. 4. Actimel, Activia, Acidko [86, 87, 96]

#### **Activia**

Activia obsahuje 2 klasické jogurtové kultury (*Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*), které jsou běžně prospěšné pro naše zdraví a navíc obsahuje unikátní živou kulturu Bifidus ActiRegularis. (Obr. 4.)

Typy produktů: bílá, ochucená, s vlákninou, lehká a fit, tvarohová a nápoje [87]

- **Olma a.s. (Olomouc)**

#### **Revital active**

Revital active (Obr. 5.) obsahuje probiotické kultury (*Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*), které se stávají každodenním pomocníkem obrany lidského organismu. Hlavními faktory, které ovlivňují zdraví člověka, je jejich ochrana zažívacího traktu, harmonizace trávení a látkové výměny.

#### **Bio jogurt drink**

Zakysaný nápoj v sobě spojuje zdraví vnášené jogurtovými a funkčními probiotickými kulturami (*Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*) s jistotou přinášenou ekologicky čistou surovinou a zpracováním. [88]

- **Meggle s.r.o. (Praha)**

**Probia drink.** Obsahuje probiotické kultury *Bifidobacterium Longum BB 536*.

Probia drink má různé příchutě: vanilka, malina, broskev a jahoda.

Kysaný nápoj – **acidofilní mléko** (obsahuje *Lactobacillus acidophilus*)

**Acidofilo 1%, Acidofilo 3,6%, Acidofilo jahoda.** [89]

- **Laktos a.s. (Rakousko)**

Probiotický nápoj laktos – **Probiotic drink** (jahoda, lesní směs, klasik) [90]

- **Zott s.r.o. (Praha)**

**Jogobella L. casei** – obsahuje *L. casei prophylactic* [91]

- **Mlékárna Kunín a.s. (Ostrava)**

**Acidofilní mléko** – *Lactobacillus acidophilus La5-Nutrish* [92]

- **Mlékárna Valašské Meziříčí, spol. s.r.o.**

**Acidofilní mléko** (Obr. 5.) (ABT kultura), **kefírové mléko**, **bio kysaný nápoj**, **jogurtové mléko** – zdravé osvěžení. [93]



Obr. 5. Acidofilní mléko, Bio jogurt drink, Zákys [88, 93, 94]

- **Madeta a.s. (České Budějovice)**

**Jihočeský zákys** (Obr. 5.) (různé příchutě), kysaný mléčný výrobek obohacený vitamíny C, E a betakarotenem, probiotika *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* a *Bifidobacterium lactis*.

**Tvaroh s jogurtem** – různé příchutě, s bifidokulturou [94]

- **Hollandia a.s. (Karlovy vary)**

**Jogurt selský** (různé příchutě), **Bifi drink** (různé příchutě) a **Aktivní jogurt** (různé příchutě). [95]

- **Firma Rajo (Slovensko)**

**Probia drink**, **Acidko**. (Obr. 4.) [96]

- **Bohušovická mlékárna (Bohušovice nad Ohří)**

**Bobík Probio** – vanilový, kakaový [97]

- **Ekomilk (Frydek Místek)**

**Jogurtový nápoj** – máta, jahoda, vanilka [98]

- **Cereal partners, s.r.o (Nestlé)**

Kojenecká výživa – **Zdravé zažívání** (Obr. 8.)

Základem kaší Nestlé Zdravé zažívání je jedinečná kombinace přátelských bakterií Bifidus BL (probiotik) a směsi prebiotické vlákniny Prebio1. Tato unikátní kombinace zajišťuje správnou ochranu střeva proti škodlivým bakteriím způsobujícím zažívací problémy (průjem, zácpa, střevní infekce apod.) a posiluje přirozeným způsobem obranyschopnost organismu. Kromě aktivních kultur Bifidus BL a směsi Prebio1 obsahují další přírodní složky jako je rýže, mrkev, oves, švestky atd., které jsou zdrojem aktivních látek ovlivňujících konzistenci a rychlost průchodu stolice, vstřebávání tekutin ve střevech nebo produkci žaludečních šťáv. [99]

- **Kmotr a.s. (Kroměříž)**

Probiotický salám

**Zeus** je trvanlivý fermentovaný salám se sníženým obsahem tuku vyráběný z vepřového masa, směsi koření. Obsahuje probiotickou kulturu *Lactobacillus casei* a inulin, které podporují růst protektivních bakterií ve střevě, od nichž se očekává pozitivní dopad na zdraví člověka. Jedná se o výrobek přirozeně bezlepkový. Nemusí se skladovat při chladírenských teplotách.

**Hádes** je trvanlivý fermentovaný salám se sníženým obsahem tuku vyráběný z vepřového masa, směsi koření. Obsahuje probiotickou kulturu *Lactobacillus casei*. Výrobek je přirozeně bezlepkový. Nemusí se skladovat při chladírenských teplotách. (Obr. 6.) [100]



Obr. 6. Hádes a Zeus [100]

## 2.5.2. Potravinové doplňky ve formě kapslí

- **Firma Klas**

**Super acidophilus plus 6 miliard** – doplněk stravy [101]

- **Merck spol. s.r.o.**

**Bion 3 junior, Bion 3, Bion 3 senior** (Obr. 7.) – (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*) [102]

- **Nutra-Bona**

**Nutra Bona symba** - symbiotický doplněk stravy, který dodává živou probiotickou mikroflóru nutnou k zajištění správné funkce střev. [103]

- **Pharma Agency, s.r.o.**

Probiotika řady **Dophilus** (Obr. 7.) tvoří nejucelenější a kvalitativně nejlepší řadu probiotik na našem trhu. Obsahují řadu sedmi přípravků pro všechny věkové skupiny populace (Infants Dophilus, Children Dophilus, Adults Dophilus, Seniors Dophilus, Women Dophilus, Travellers Dophilus, Super Dophilus). [104]



Obr. 7. Super acidophilus, Bion3, Flora Protect Probiotics [101, 102, 105]

- **DrNatura**

**Flora Protect® Probiotics** (Obr. 7.)

Vysoce účinný, lyofilizovaný, profesionálně vyvinutý probiotický doplněk na rostlinné bázi. Obsahuje 8 různých druhů přátelských bakterií s minimálně 4 miliardy buněk v jedné kapsli. Vyvinuté tak, aby organismu poskytly vyváženou směs důležitých druhů střevních bakterií. Vhodné pro vegetariány. [105]

- **ASP CZECH s.r.o (Slušovice)**

**Protexin Restore, Protexin Vitality** - poskytuje sedm kmenů probiotických bakterií (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* (specifická dětská kultura), *Lactobacillus bulgaricus*), které přirozeně obývají trávicí ústrojí zdravých dětí.

**Lepicol** (*Psyllium Husk*, *Cichorium intybus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*)

**Lepicol Plus** (*Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum*)

**Lepicol pro děti** (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*) [106]

- **Delpharmea Nutraceuticals, a. s.**

**Probian** – koncentrovaná přírodní probiotika v tabletách. (Obr. 8)

Obsahuje 10 miliard účinných bakterií v jedné tobolce – *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium longum*. [107]



Obr. 8. Zdravé zažívání, Probian [99, 107]

- **Atlanta**

**Sanosol Probioticum** (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*)

- **Brainway Inc.**

**BioPRO** (*Lactobacillus acidophilus* (DDS-1), *Sporolactobacillus sp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, fruktooligosacharidy z banánu, růstový faktor laktobacilů a vitamin B5)

- **S&D Pharma**

**Lactovita** (*Lactobacillus sporogenes*)

**Nutrolin-B** (*Lactobacillus sporogenes*)

- **Dr. Staněk**

**Stimulsin** (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*)

- **Energy**

**Probiosan** (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*)

- **Favea**

**Probioenzym** (*Lactobacillus acidophilus*)

- **Ferrosan Czech s.r.o.**

**Biform Kid** (od 3 let) (*Lactobacillus Rhamnosus* GG (LGG®), *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BB-12))

**Multi-tabs Immuno kid, Multi-tabs Immuno Plus** (*Lactobacillus rhamnosus*)

- **Generica**

**Biolac** (laktobacily a bifidobakterie)

- **Goldim**

**Probioflora** (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Streptococcus thermophilus*)

- **Rapeto, s.r.o.**

**Pangamin Bofo, Pangamin Bifi Plus** (bifidobakterie, laktobacily)

- **Rougier, s.r.o.**

**Lacidofil** (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*)

- **Valosun**

**Biopron 9** (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Streptococcus thermophilus*)

**Biopron junior** (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*)

- **Vita Harmony**

**Lactomax** (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium sp.*) [108]

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Materiál

Všechny mléčné výrobky použité ke stanovení byly zakoupeny v síti brněnských supermarketů, pouze probiotický salám byl zakoupen v prodejně masny Kmotr a.s..

Základní členění kysaných mléčných výrobků a předepsané minimální množství živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích jsou uvedeny ve Vyhlášce Ministerstva zemědělství č.77/2003 Sb.

#### Seznam výrobků použitých k rozboru

Danone (ČR)

Actimel - jogurtové mléko s *L. casei* imunitass, bílé, 1,1% tuku (Obr. 4.)

deklarovaná probiotická kultura: *Lactobacillus casei imunitass*

Activia bílá - jogurt s bifidokulturou, 3 % tuku (Obr. 4.)

deklarovaná probiotická kultura: *Bifidobacterium sp.*

výrobce: Danone – Polsko

Olma (ČR)

Revital active - probiotický kysaný mléčný nápoj se sníženým obsahem tuku a aktivními složkami, Aloe vera, 1 % tuku (Obr. 5.)

deklarovaná probiotická kultura: *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*

Holandia (ČR)

Jogurt selský bílý s probiotickou kulturou, bílý, 3,5 % tuku

deklarovaná probiotická kultura: *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus*

Mlékárna Valašské Meziříčí (ČR)

Kefírové mléko nízkotučné s ABT kulturou, meruňkové, 0,8 % tuku (Obr. 5.)

deklarovaná probiotická kultura: *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*

Kmotr a.s. (ČR)

Trvanlivé fermentované salámy s probio kulturou, Zeus, Hádes, 32 % tuku (Obr. 6.)

Deklarovaná probiotická kultura: *Lactobacillus casei*

#### 4.1.1. Živná média

##### Modified Skim Milk Agar (HiMedia Laboratories, India)

Modified Skim Milk Agar (MSMA) se používá pro kultivaci a stanovení počtů mikroorganismů v mléce a mléčných výrobcích. Složení přípravku odpovídá požadavkům ČSN ISO 6610; 6730 a 8553.



Složení (v gramech na litr destilované vody):

Enzymatický kasein	
Hydrolyzáty	5,00
Kvasinkový extrakt	2,50
Glukosa monohydrát	1,00
Sušené odstředěné mléko	1,00
Agar	15,00
Konečné pH	7,00±0,20

Dehydratované médium bylo naváženo dle návodu na obsah vody a rozvařeno v autoklávu při teplotě 121°C. Po zchlazení na teplotu 45-50°C byla půda nalévána do misek.

### **Lactobacillus MRS broth**

MRS se používá pro izolaci a kultivaci laktobacilů.

Složení (v gramech na litr destilované vody):

Proteosový pepton	10,00
Včelí extrakt	10,00
Kvasinkový extrakt	5,00
Dextrosa	20,00
Polysorbát 80	1,00
Citran amonný	2,00
Octan sodný	5,00
Síran hořečnatý	0,10
Síran manganatý	0,05
Fosforečnan draselný	2,00
Konečné pH	6,50±0,20

Dehydratované médium bylo naváženo dle návodu na obsah vody a rozvařeno v autoklávu při teplotě 121 °C. Po zchlazení na teplotu 45-50 °C byla půda nalévána do misek.

### **4.1.2. Chemikálie pro barvení**

Krystalová violet  
Lugolův roztok  
Karbolfuchsin

### **4.1.3. Rostoky**

Sterilní voda  
Ethanol

### **4.1.4. Přístroje a pomůcky**

Analytické váhy

Autokláv (121 °C)  
Chladnička (4 °C)  
Termostat (37 °C)  
Anaerostat (37 °C)  
Laboratorní mikroskop  
Běžné laboratorní sklo, laboratorní materiál a pomůcky

## **4.2. Metody**

### **4.2.1. Příprava živných půd**

Dle návodu na obalu bylo smícháno předepsané množství sušeného živného média (MSMA nebo MRS bujón + agar) a doplněno destilovanou vodou na výsledný objem 200 ml. Takto připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu (121 °C) a rozlito do 12 sterilních Petriho misek. Na jeden vzorek bylo použito 12 misek s MRS a 12 misek s MSMA.

### **3.2.2. Příprava vzorku**

Z každého vzorku bylo provedeno desítkové ředění ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ).

U tekutého vzorku byl pipetován 1 ml přímo do zkumavky se sterilní vodou, u tuhé vzorku bylo naváženo 10 g do Erlenmayerovy baňky s 90 ml sterilní vody, kde byl vzorek po dobu 5 minut homogenizován pomocí kuliček a třepání.

### **4.2.3. Kultivace**

Do nachystaných Petriho misek bylo roztěrem naočkováno 0,1 ml naředěného vzorku, vždy ředění  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ . Od každého ředění byly 4 Petriho misky MRS a 4 Petriho misky MSMA, z čehož se 2 Petriho misky od každé půdy kultivovaly aerobně a 2 anaerobně. Všechny naočkované misky byly kultivovány při 37 °C po dobu 48 hodin.

### **4.2.4. Barvení podle Grama**

Do kapky sterilní vody na podložním sklíčku byla po kultivaci odebrána část bakteriální kultury z Petriho misek. Po zaschnutí byl takto připravený preparát fixován plamenem a ponořen na 20 sekund do kyvety s krystalovou violetí. Poté byl preparát opláchnut vodou a ponořen na 30 sekund do Lugolova roztoku. Následovalo odbarvení ethanolem po dobu 20 sekund a nakonec dobarvení karbolfuchsinem během 60 sekund. Jednotlivé preparáty byly pozorovány mikroskopem pod imerzním objektivem (zvětšení 100x).

## **4.3. Výsledky**

Ve všech vzorcích probiotických potravin se nám podařilo kultivací dokázat přítomnost bakterií mléčného kvašení. Po kultivaci byly spočítány kolonie a pomocí výpočtu byl zjištěn celkový počet životaschopných bakterií v daném množství či objemu vzorku. Přerostlé misky (tedy misky s více než 300 koloniemi) nebyly zahrnuty do výpočtu. Vybrané preparáty byly pozorovány pod mikroskopem a byly z nich pořízeny fotografie. (Příloha 1-9)

Příklad výpočtu KTJ v 1 ml (1 g):

$$x = X \cdot z \cdot 10 \quad (\text{č. 1})$$

kde:

X je průměrný počet kolonií ze 2 paralelních Petriho misek

z použité ředění

10 přepočet pro očkované množství (0,1 ml)

#### **4.3.1. Výsledné průměrné počty mléčných bakterií ve vybraných výrobcích**

Bylo hodnoceno 5 různých typů mléčných výrobků a 2 salámy. Od každého mléčného výrobku bylo odebráno 5 kusů vzorků, od salámu po 1 kuse. U každého vzorku byly spočítány základní statistické charakteristiky. Zjištěné počty mléčných bakterií v 1 ml (g) výrobku jsou uvedeny v tab. 1-54. Výsledky jsou uvedené ve tvaru průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

Tabulka 1.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při aerobní kultivaci

Actimel 1	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		86,67	9,00
	KTJ/1 ml	N	$8,67 \cdot 10^8$	$9,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,83 \cdot 10^8 \pm 0,23 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		34,00	2,33
	KTJ/1 ml	N	$3,40 \cdot 10^8$	$2,33 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,87 \cdot 10^8 \pm 0,74 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 2.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při anaerobní kultivaci

Actimel 1	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		95,33	9,67
	KTJ/1 ml	N	$9,53 \cdot 10^8$	$9,67 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>9,60 \cdot 10^8 \pm 0,09 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		38,33	2,33
	KTJ/1 ml	N	$3,83 \cdot 10^8$	$2,33 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,08 \cdot 10^8 \pm 1,04 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 3.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při aerobní kultivaci

Actimel 2	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		69,00	6,67
	KTJ/1 ml	N	$6,90 \cdot 10^8$	$6,67 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,78 \cdot 10^8 \pm 0,16 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		56,33	5,33
	KTJ/1 ml	N	$5,63 \cdot 10^8$	$5,33 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,48 \cdot 10^8 \pm 0,21 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 4.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při anaerobní kultivaci

Actimel 2	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		77,67	8,00
	KTJ/1 ml	N	$7,77 \cdot 10^8$	$8,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,88 \cdot 10^8 \pm 0,16 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		78,00	7,00
	KTJ/1 ml	N	$7,80 \cdot 10^8$	$7,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,40 \cdot 10^8 \pm 0,55 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 5.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při aerobní kultivaci

Actimel 3	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		91,00	8,33
	KTJ/1 ml	N	$9,10 \cdot 10^8$	$8,33 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,72 \cdot 10^8 \pm 0,53 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		41,33	4,00
	KTJ/1 ml	N	$4,13 \cdot 10^8$	$4,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>4,07 \cdot 10^8 \pm 0,09 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 6.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při anaerobní kultivaci

Actimel 3	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		80,67	5,67
	KTJ/1 ml	N	$8,07 \cdot 10^8$	$5,67 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,87 \cdot 10^8 \pm 1,66 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		32,00	3,33
	KTJ/1 ml	N	$3,20 \cdot 10^8$	$3,33 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,27 \cdot 10^8 \pm 0,09 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 7.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při aerobní kultivaci

Actimel 4	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		81,67	9,00
	KTJ/1 ml	N	$8,17 \cdot 10^8$	$9,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,58 \cdot 10^8 \pm 0,58 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		43,67	7,00
	KTJ/1 ml	N	$4,37 \cdot 10^8$	$7,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,68 \cdot 10^8 \pm 1,82 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 8.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při anaerobní kultivaci

Actimel 4	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		84,00	9,00
	KTJ/1 ml	N	$8,40 \cdot 10^8$	$9,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,70 \cdot 10^8 \pm 0,42 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		65,33	7,33
	KTJ/1 ml	N	$6,53 \cdot 10^8$	$7,33 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,93 \cdot 10^8 \pm 0,55 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 9.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při aerobní kultivaci

Actimel 5	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		85,00	9,00
	KTJ/1 ml	N	$8,50 \cdot 10^8$	$9,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,75 \cdot 10^8 \pm 0,35 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		48,33	5,67
	KTJ/1 ml	N	$4,83 \cdot 10^8$	$5,67 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,25 \cdot 10^8 \pm 0,58 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 10.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Actimelu při anaerobní kultivaci

Actimel 5	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		103,00	8,33
	KTJ/1 ml	N	$1,03 \cdot 10^9$	$8,33 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>9,32 \cdot 10^8 \pm 1,36 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		73,33	6,33
	KTJ/1 ml	N	$7,33 \cdot 10^8$	$6,33 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,83 \cdot 10^8 \pm 0,69 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné



Tabulka 11.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při aerobní kultivaci

Activia 1	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		85,00	8,00
	KTJ/1 ml	N	$8,50 \cdot 10^8$	$8,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,25 \cdot 10^8 \pm 0,346 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	1,33	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$1,33 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>0,44 \cdot 10^6 \pm 0,711 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 12.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při anaerobní kultivaci

Activia 1	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		90,50	9,00
	KTJ/1 ml	N	$9,05 \cdot 10^8$	$9,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>9,03 \cdot 10^8 \pm 0,04 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	2,50	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$2,50 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>0,83 \cdot 10^6 \pm 1,334 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 13.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při aerobní kultivaci

Activia 2	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		68,50	8,50
	KTJ/1 ml	N	$6,85 \cdot 10^8$	$8,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,67 \cdot 10^8 \pm 5,1 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	2,00	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$2,00 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>0,66 \cdot 10^6 \pm 1,067 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 14.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při anaerobní kultivaci

Activia 2	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		72,00	10,00
	KTJ/1 ml	N	$7,20 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,60 \cdot 10^8 \pm 1,94 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	2,00	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$2,00 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>0,67 \cdot 10^6 \pm 1,07 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 15.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při aerobní kultivaci

Activia 3	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		58,00	3,00
	KTJ/1 ml	N	$5,80 \cdot 10^8$	$3,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>4,40 \cdot 10^8 \pm 1,94 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	3,00	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$3,00 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,00 \cdot 10^6 \pm 1,60 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 16.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při anaerobní kultivaci

Activia 3	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		62,50	8,00
	KTJ/1 ml	N	$6,25 \cdot 10^8$	$8,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,13 \cdot 10^8 \pm 1,21 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	2,00	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$2,00 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>0,67 \cdot 10^6 \pm 1,07 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 17.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při aerobní kultivaci

Activia 4	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		49,50	2,00
	KTJ/1 ml	N	$4,95 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,47 \cdot 10^8 \pm 2,04 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	4,50	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$4,50 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,50 \cdot 10^6 \pm 2,40 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 18.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při anaerobní kultivaci

Activia 4	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		66,00	5,50
	KTJ/1 ml	N	$6,60 \cdot 10^8$	$5,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,05 \cdot 10^8 \pm 0,76 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	3,50	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$3,50 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,17 \cdot 10^6 \pm 1,867 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 19.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při aerobní kultivaci

Activia 5	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		60,00	3,00
	KTJ/1 ml	N	$6,00 \cdot 10^8$	$3,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>4,50 \cdot 10^8 \pm 2,07 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	5,50	0,50	0,00
	KTJ/1 ml	$5,50 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^6$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,83 \cdot 10^6 \pm 2,93 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 20.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Activie při anaerobní kultivaci

Activia 5	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		86,50	8,00
	KTJ/1 ml	N	$8,65 \cdot 10^8$	$8,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,32 \cdot 10^8 \pm 0,45 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	5,50	0,00	0,00
	KTJ/1 ml	$5,50 \cdot 10^6$	0,00	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,83 \cdot 10^6 \pm 2,93 \cdot 10^6</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 21.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při aerobní kultivaci

Holandia 1	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		74,00	7,00
	KTJ/1 ml	N	$7,40 \cdot 10^8$	$7,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,20 \cdot 10^8 \pm 0,28 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	19,33	2,33	0,00
	KTJ/1 ml	$1,93 \cdot 10^7$	$2,33 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,42 \cdot 10^7 \pm 1,15 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 22.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při anaerobní kultivaci

Holandia 1	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		69,00	7,00
	KTJ/1 ml	N	$6,90 \cdot 10^8$	$7,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,95 \cdot 10^8 \pm 0,07 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	114,50	28,50	3,00
	KTJ/1 ml	$1,14 \cdot 10^8$	$2,85 \cdot 10^8$	$3,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,33 \cdot 10^8 \pm 0,95 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 23.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při aerobní kultivaci

Holandia 2	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		64,00	4,50
	KTJ/1 ml	N	$6,40 \cdot 10^8$	$4,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,45 \cdot 10^8 \pm 1,32 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	35,00	2,50	0,00
	KTJ/1 ml	$3,50 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,00 \cdot 10^7 \pm 1,66 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 24.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při anaerobní kultivaci

Holandia 2	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		66,00	4,00
	KTJ/1 ml	N	$6,60 \cdot 10^8$	$4,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,30 \cdot 10^8 \pm 1,80 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	134,50	19,00	3,50
	KTJ/1 ml	$1,35 \cdot 10^8$	$1,90 \cdot 10^8$	$3,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,25 \cdot 10^8 \pm 1,03 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 25.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při aerobní kultivaci

Holandia 3	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		56,00	3,50
	KTJ/1 ml	N	$5,60 \cdot 10^8$	$3,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>4,55 \cdot 10^8 \pm 1,45 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	10,00	0,50	0,00
	KTJ/1 ml	$1,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^6$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>0,50 \cdot 10^7 \pm 0,46 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 26.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při anaerobní kultivaci

Holandia 3	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		84,50	6,00
	KTJ/1 ml	N	$8,45 \cdot 10^8$	$6,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,22 \cdot 10^8 \pm 1,69 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	122,50	25,00	2,50
	KTJ/1 ml	$1,23 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,08 \cdot 10^8 \pm 0,68 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné



Tabulka 27.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při aerobní kultivaci

Holandia 4	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		62,00	4,00
	KTJ/1 ml	N	$6,20 \cdot 10^8$	$4,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,10 \cdot 10^8 \pm 1,52 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	25,00	1,50	0,00
	KTJ/1 ml	$2,50 \cdot 10^7$	$1,50 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,33 \cdot 10^7 \pm 1,16 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 28.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při anaerobní kultivaci

Holandia 4	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		80,50	6,00
	KTJ/1 ml	N	$8,05 \cdot 10^8$	$6,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,03 \cdot 10^8 \pm 1,42 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	111,50	24,50	3,00
	KTJ/1 ml	$1,12 \cdot 10^8$	$2,45 \cdot 10^8$	$3,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,19 \cdot 10^8 \pm 0,31 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 29.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při aerobní kultivaci

Holandia 5	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		61,00	6,00
	KTJ/1 ml	N	$6,10 \cdot 10^8$	$6,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,05 \cdot 10^8 \pm 0,07 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	5,00	0,50	0,00
	KTJ/1 ml	$5,00 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^6$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>0,33 \cdot 10^7 \pm 0,27 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 30.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Holandie při anaerobní kultivaci

Holandia 5	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		72,50	7,50
	KTJ/1 ml	N	$7,25 \cdot 10^8$	$7,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,37 \cdot 10^8 \pm 0,17 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	116,50	12,50	0,50
	KTJ/1 ml	$1,17 \cdot 10^8$	$1,25 \cdot 10^8$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>0,97 \cdot 10^8 \pm 0,38 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 31.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při aerobní kultivaci

Kefír 1	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	35,00	3,50	0,50
	KTJ/1 ml	$3,50 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>4,00 \cdot 10^7 \pm 0,80 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	24,50	3,50	1,00
	KTJ/1 ml	$2,45 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,32 \cdot 10^7 \pm 3,77 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 32.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při anaerobní kultivaci

Kefír 1	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	22,50	2,00	0,50
	KTJ/1 ml	$2,25 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	$0,50 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,08 \cdot 10^7 \pm 1,53 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	26,00	3,00	0,50
	KTJ/1 ml	$2,60 \cdot 10^7$	$3,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,53 \cdot 10^7 \pm 1,18 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 33.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při aerobní kultivaci

Kefír 2	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	15,50	2,50	0,50
	KTJ/1 ml	$1,55 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,48 \cdot 10^7 \pm 1,23 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	24,50	4,00	0,50
	KTJ/1 ml	$2,45 \cdot 10^7$	$4,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,82 \cdot 10^7 \pm 1,18 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 34.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při anaerobní kultivaci

Kefír 2	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	23,00	2,00	0,00
	KTJ/1 ml	$2,30 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,43 \cdot 10^7 \pm 1,15 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	19,00	2,00	0,00
	KTJ/1 ml	$1,90 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,30 \cdot 10^7 \pm 1,042 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 35.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při aerobní kultivaci

Kefír 3	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	46,00	4,50	0,50
	KTJ/1 ml	$4,60 \cdot 10^7$	$4,50 \cdot 10^7$	0,50
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>4,70 \cdot 10^7 \pm 0,24 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	38,00	5,50	0,50
	KTJ/1 ml	$3,80 \cdot 10^7$	$5,50 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>4,77 \cdot 10^7 \pm 0,81 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 36.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při anaerobní kultivaci

Kefír 3	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	26,00	2,00	0,50
	KTJ/1 ml	$2,60 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,20 \cdot 10^7 \pm 1,47 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	20,00	2,00	0,50
	KTJ/1 ml	$2,00 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,00 \cdot 10^7 \pm 1,60 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 37.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při aerobní kultivaci

Kefír 4	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	31,00	2,50	0,50
	KTJ/1 ml	$3,10 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,53 \cdot 10^7 \pm 1,21 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	35,00	3,500	1,00
	KTJ/1 ml	$3,50 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,66 \cdot 10^7 \pm 3,46 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 38.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při anaerobní kultivaci

Kefír 4	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	23,50	2,00	0,50
	KTJ/1 ml	$2,35 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,11 \cdot 10^7 \pm 1,51 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	18,00	2,00	0,50
	KTJ/1 ml	$1,80 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,93 \cdot 10^7 \pm 1,66 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 39.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při aerobní kultivaci

Kefír 5	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	29,00	5,00	0,50
	KTJ/1 ml	$2,90 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>4,30 \cdot 10^7 \pm 1,12 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	30,00	6,00	1,00
	KTJ/1 ml	$3,00 \cdot 10^7$	$6,00 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,33 \cdot 10^7 \pm 3,24 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 40.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Kefíru při anaerobní kultivaci

Kefír 5	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	25,00	2,00	0,50
	KTJ/1 ml	$2,55 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>3,11 \cdot 10^7 \pm 1,51 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	9,50	1,50	0,50
	KTJ/1 ml	$9,50 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,48 \cdot 10^7 \pm 2,03 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 41.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při aerobní kultivaci

Revital 1	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		63,50	11,00
	KTJ/1 ml	N	$6,35 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,67 \cdot 10^8 \pm 3,22 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	18,00	2,00	0,50
	KTJ/1 ml	$1,80 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,93 \cdot 10^7 \pm 1,66 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 42.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při anaerobní kultivaci

Revital 1	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		96,50	11,50
	KTJ/1 ml	N	$9,65 \cdot 10^8$	$1,15 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>10,6 \cdot 10^8 \pm 1,28 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		81,50	9,50
	KTJ/1 ml	N	$8,15 \cdot 10^8$	$9,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,83 \cdot 10^8 \pm 0,93 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné



Tabulka 43.: *Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při aerobní kultivaci*

Revital 2	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		63,00	10,50
	KTJ/1 ml	N	$6,30 \cdot 10^8$	$1,05 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,40 \cdot 10^8 \pm 2,91 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	20,00	5,50	1,00
	KTJ/1 ml	$2,00 \cdot 10^7$	$5,50 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>5,83 \cdot 10^7 \pm 3,71 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 44.: *Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při anaerobní kultivaci*

Revital 2	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		102,00	11,50
	KTJ/1 ml	N	$1,02 \cdot 10^9$	$1,15 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>10,9 \cdot 10^8 \pm 0,09 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		80,00	6,50
	KTJ/1 ml	N	$8,00 \cdot 10^8$	$6,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>7,25 \cdot 10^8 \pm 1,04 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 45.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při aerobní kultivaci

Revital 3	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		79,50	11,00
	KTJ/1 ml	N	$7,95 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>9,48 \cdot 10^8 \pm 2,11 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	16,00	3,00	0,00
	KTJ/1 ml	$1,60 \cdot 10^7$	$3,00 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>1,53 \cdot 10^7 \pm 1,38 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 46.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při anaerobní kultivaci

Revital 3	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		103,50	7,00
	KTJ/1 ml	N	$1,04 \cdot 10^9$	$7,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,68 \cdot 10^8 \pm 2,32 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		90,00	7,50
	KTJ/1 ml	N	$9,00 \cdot 10^8$	$7,50 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,25 \cdot 10^8 \pm 1,04 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 47.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při aerobní kultivaci

Revital 4	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		66,00	11,00
	KTJ/1 ml	N	$6,60 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>8,80 \cdot 10^8 \pm 3,05 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	10,00	2,00	0,50
	KTJ/1 ml	$1,00 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,67 \cdot 10^7 \pm 1,92 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 48.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při anaerobní kultivaci

Revital 4	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		118,00	10,00
	KTJ/1 ml	N	$1,18 \cdot 10^9$	$1,00 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>10,90 \cdot 10^8 \pm 1,24 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		99,00	9,00
	KTJ/1 ml	N	$9,90 \cdot 10^8$	$9,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>9,45 \cdot 10^8 \pm 0,06 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 49.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při aerobní kultivaci

Revital 5	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		62,00	6,00
	KTJ/1 ml	N	$6,20 \cdot 10^8$	$6,00 \cdot 10^8$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>6,10 \cdot 10^8 \pm 0,14 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	9,00	1,00	0,50
	KTJ/1 ml	$9,00 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>2,30 \cdot 10^7 \pm 2,16 \cdot 10^7</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 50.: Počty mléčných bakterií v 1 ml Revitalu při anaerobní kultivaci

Revital 5	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		120,00	11,50
	KTJ/1 ml	N	$1,20 \cdot 10^9$	$1,15 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>11,80 \cdot 10^8 \pm 0,35 \cdot 10^8</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií		102,50	11,00
	KTJ/1 ml	N	$1,03 \cdot 10^9$	$1,10 \cdot 10^9$
	<b>KTJ/1 ml</b>	<b><math>10,60 \cdot 10^8 \pm 0,05 \cdot 10^8</math></b>		

N = nepočitatelné

Tabulka 51.: Počty mléčných bakterií v 1g salámu Zeus při aerobní kultivaci

Salám 1	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	56,00	3,50	0,00
	KTJ/1 g	$5,60 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 g</b>	<b><math>3,03 \cdot 10^7 \pm 2,61 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	50,50	5,50	0,00
	KTJ/1 g	$5,05 \cdot 10^7$	$5,50 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 g</b>	<b><math>3,52 \cdot 10^7 \pm 2,82 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 52.: Počty mléčných bakterií v 1g salámu Zeus při anaerobní kultivaci

Salám 1	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	68,50	4,00	0,00
	KTJ/1 g	$6,85 \cdot 10^7$	$4,00 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 g</b>	<b><math>3,62 \cdot 10^7 \pm 3,18 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	31,00	4,50	0,00
	KTJ/1 g	$3,10 \cdot 10^7$	$4,50 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 g</b>	<b><math>2,53 \cdot 10^7 \pm 2,13 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 53.: Počty mléčných bakterií v 1g salámu Hádes při aerobní kultivaci

Salám 2	Aerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	35,50	4,50	0,50
	KTJ/1 g	$3,55 \cdot 10^7$	$4,50 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 g</b>	<b><math>4,35 \cdot 10^7 \pm 0,68 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	26,00	2,00	0,00
	KTJ/1 g	$2,60 \cdot 10^7$	$2,00 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 g</b>	<b><math>1,53 \cdot 10^7 \pm 1,26 \cdot 10^7</math></b>		

Tabulka 54.: Počty mléčných bakterií v 1g salámu Hádes při anaerobní kultivaci

Salám 2	Anaerobně			
MSMA	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	27,50	2,50	0,00
	KTJ/1 g	$2,75 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	0,00
	<b>KTJ/1 g</b>	<b><math>1,75 \cdot 10^7 \pm 1,41 \cdot 10^7</math></b>		
MRS	ředění	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
	průměrný počet kolonií	32,00	3,50	0,50
	KTJ/1 g	$3,20 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^7$
	<b>KTJ/1 g</b>	<b><math>3,90 \cdot 10^7 \pm 0,89 \cdot 10^7</math></b>		

## 4.4. Diskuze

V současné době se vyrábí široká škála mléčných fermentovaných výrobků. Také se začínají stále více objevovat jiné než mléčné potraviny s obsahem prospěšných bakterií. Celková spotřeba neustále stoupá, zejména díky jejich prospěšnému vlivu na zdraví člověka.

Podle Vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb. se jako fermentovaný mléčný výrobek označuje výrobek, který je získán kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsi za použití mikroorganismů mléčného kysání, tepelně neošetřený po kysacím procesu. Tato vyhláška též stanovuje pro jednotlivé skupiny kysaných mléčných výrobků množství bakterií použité mikrobiální kultury. [62]

### 4.4.1. Srovnání živných médií

Všechny vzorky byly kultivovány na 2 živných médiích (MRS a MSMA). Ve všech případech se osvědčil MSMA jako lepší, dával vyšší výsledky, přestože kolonie byly mnohdy menší. Může to být způsobeno i tím, že MRS je půda určená zejména pro rod *Lactobacillus*, kdežto MSMA je pro všechny mléčné bakterie. Jako příklad je vhodný jogurt Activia, který na MRS nevykazuje téměř žádný růst, protože hlavní zastoupenou kulturou jsou bifidobakterie.

### 4.4.2. Srovnání výrobků

Při stanovení počtu bakterií mléčného kvašení ve výrobcích byl nejvyšší počet zjištěn u mléčného nápoje Actimel, kde průměrný počet z 5 vzorků byl  $8,33 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u aerobní kultivace a  $8,47 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u anaerobní kultivace (Graf 1-4), přičemž jednotlivé Actimely se od sebe lišily minimálně.

Druhý výrobek s nejvyšším počtem bakterií byl Revital active s příchutí Aloe vera, kde byl průměrný počet bakterií  $8,29 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u aerobní a  $1,06 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u anaerobní kultivace. (Graf 17-20)

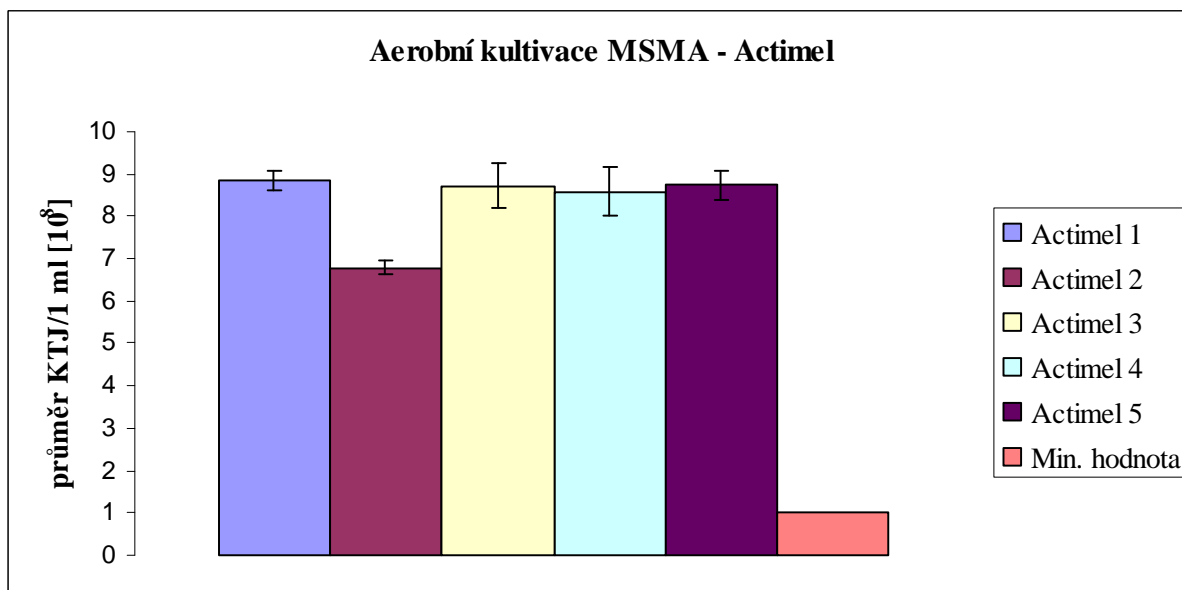
Jogurt Activia obsadil třetí místo s průměrným počtem  $5,60 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u aerobní kultivace a  $7,80 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u anaerobní kultivace. (Graf 5-8) Tyto výsledky byly prokázány pouze na půdě MSMA, protože u tohoto výrobku je mnohem významnější obsah rodu *Bifidobacterium*, které na půdě MRS roste minimálně, z důvodu selekce této půdy na rod *Lactobacillus*.

U výrobku Holandia byl průměrný počet  $5,67 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u aerobní kultivace a  $0,67 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u anaerobní kultivace. (Graf 9-12)

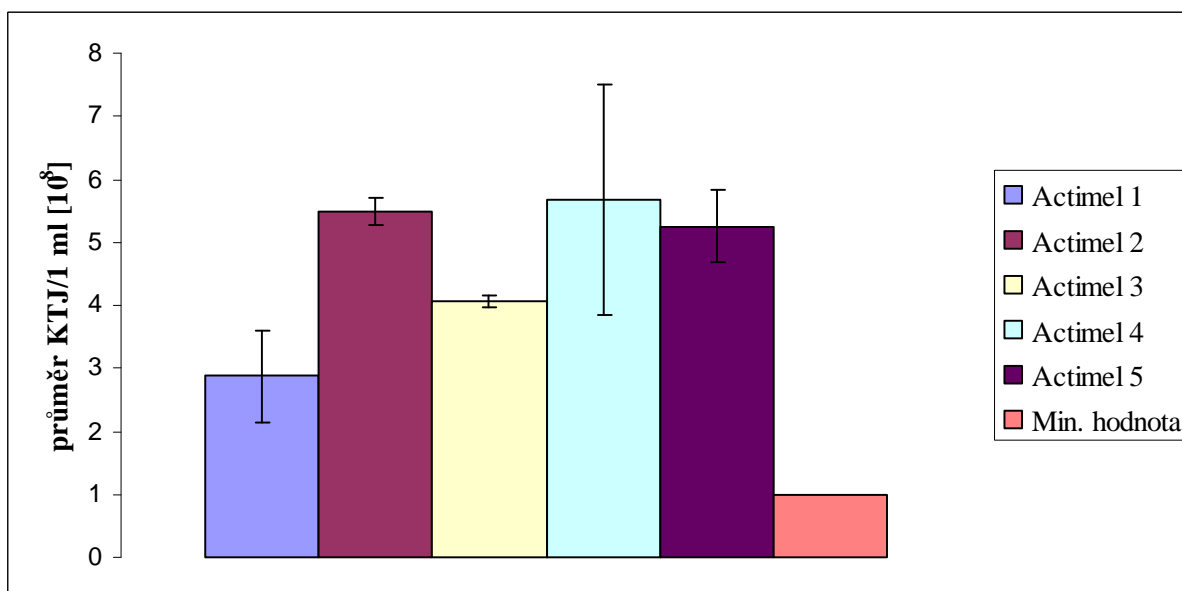
Nízký počet bakterií byl vyhodnocen u výrobku Kefír s meruňkovou příchutí, kde byl průměrný počet bakterií  $0,40 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u aerobní kultivace a  $0,28 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml u anaerobní kultivace. (Graf 13-16)

Nejnižší počet mléčných bakterií byl zjištěn u salámu Zeus a Hádes a to v řádech  $10^6 - 10^7$  KTJ/1 g. (Graf 21-24)

Všechny mléčné výrobky vykazují hodnoty bakterií mléčného kvašení v řádu  $10^7 - 10^8$  KTJ/1 ml, takže můžeme konstatovat, že splňují legislativní požadavky. (Graf 25-28) Minimální hodnotu pro mléčné bakterie v salámu vyhláška neudává, takže výsledné hodnoty byly srovnány s hodnotou pro mléčné výrobky.

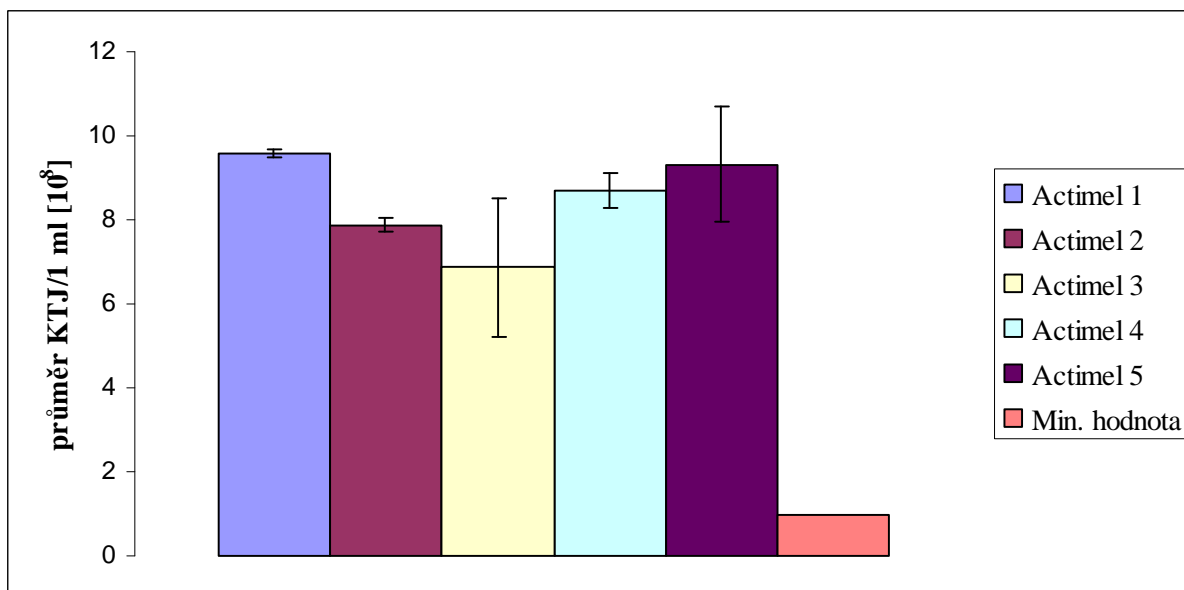


*Graf 1.: Průměrný počet mléčných bakterií v Actimelu na MSMA při aerobní kultivaci*  
*Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.*

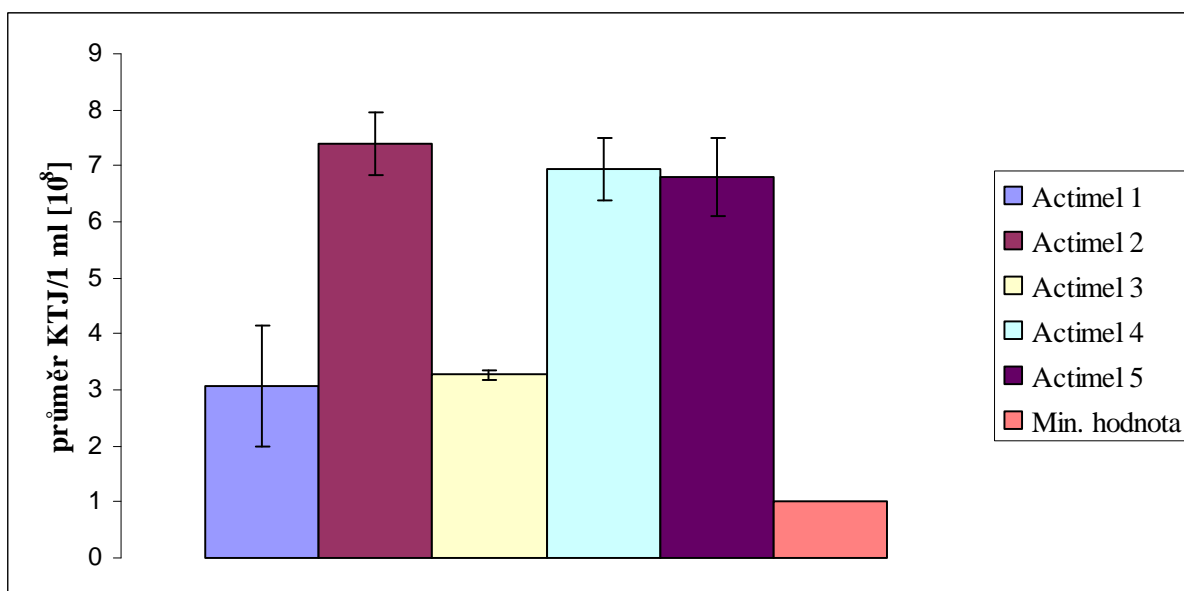


*Graf 2.: Průměrný počet mléčných bakterií v Actimelu na MRS při aerobní kultivaci*  
*Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.*

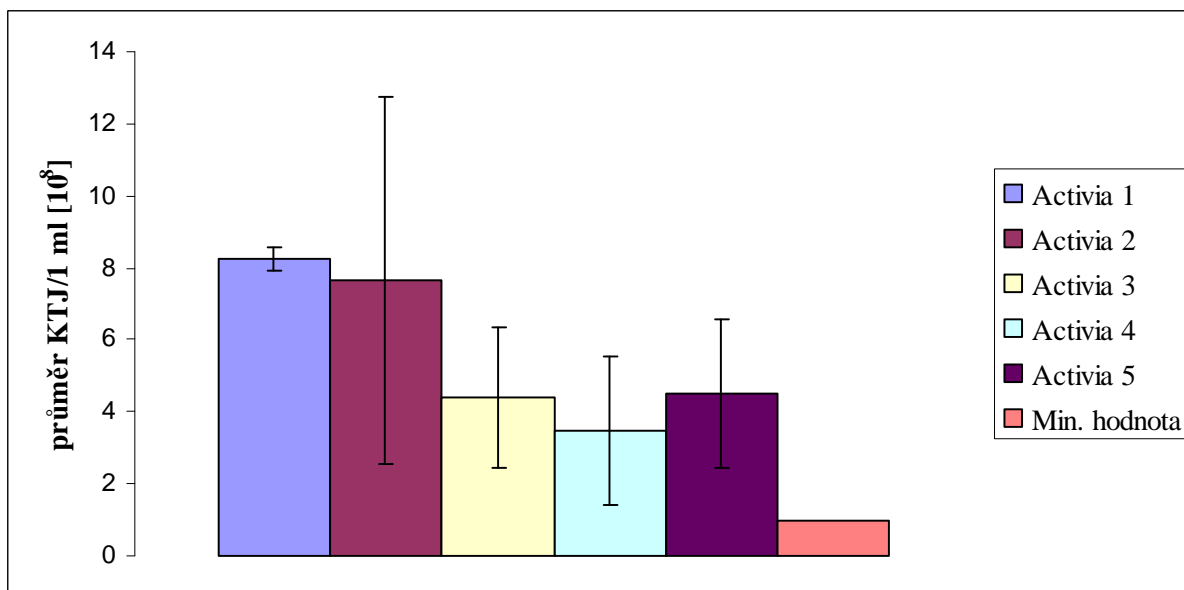




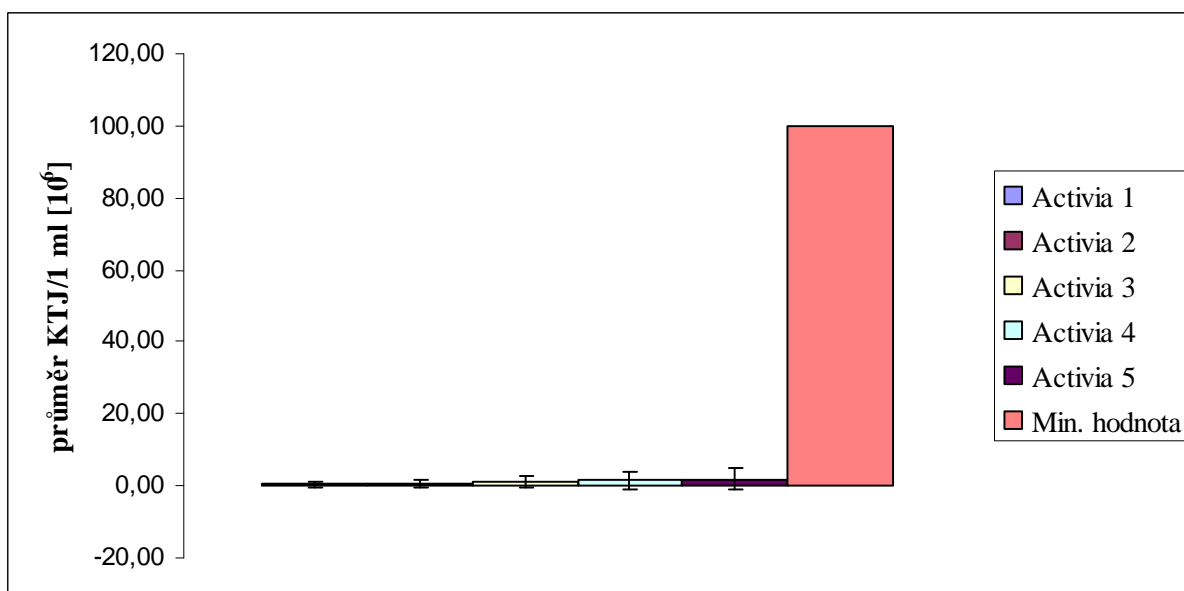
Graf 3.: Průměrný počet mléčných bakterií v Actimelu na MSMA při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



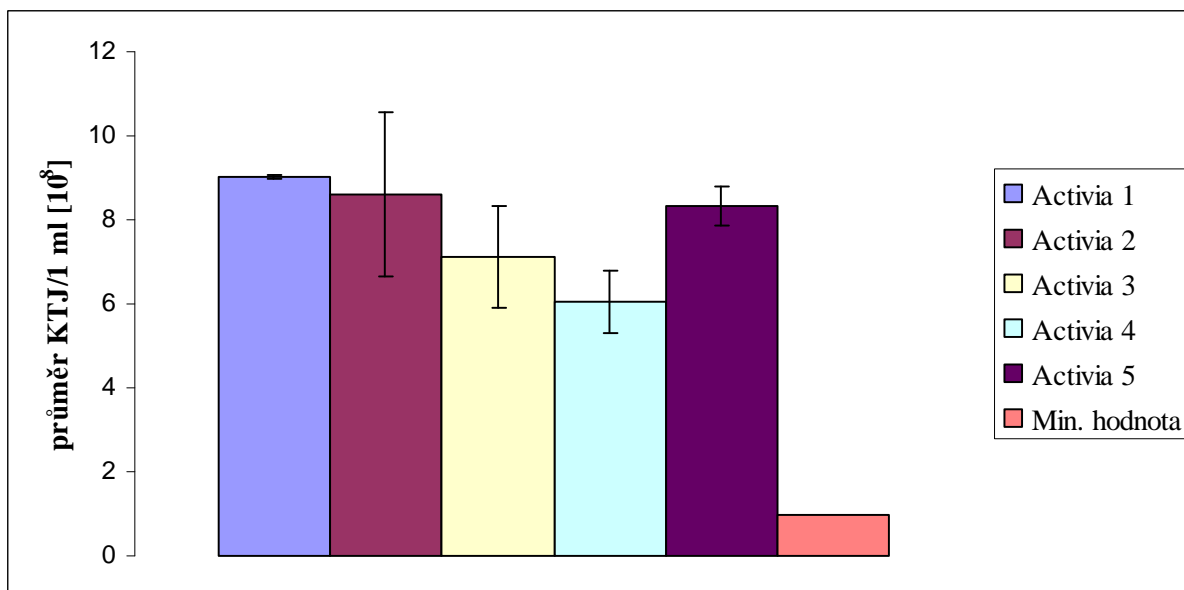
Graf 4.: Průměrný počet mléčných bakterií v Actimelu na MRS při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



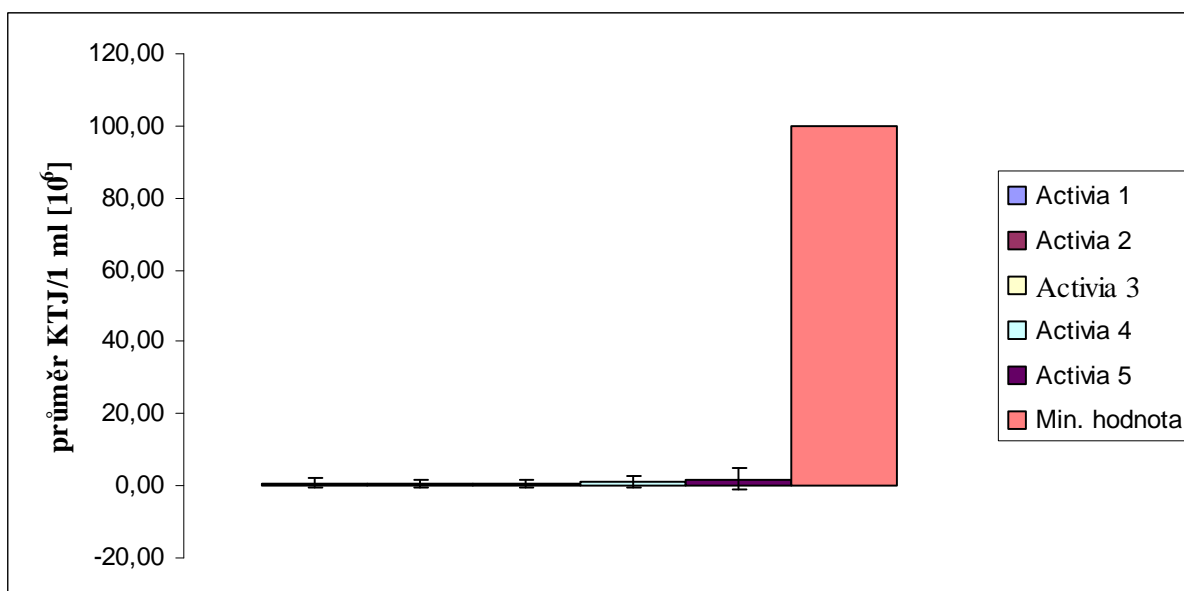
Graf 5.: Průměrný počet mléčných bakterií v Activii na MSMA při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



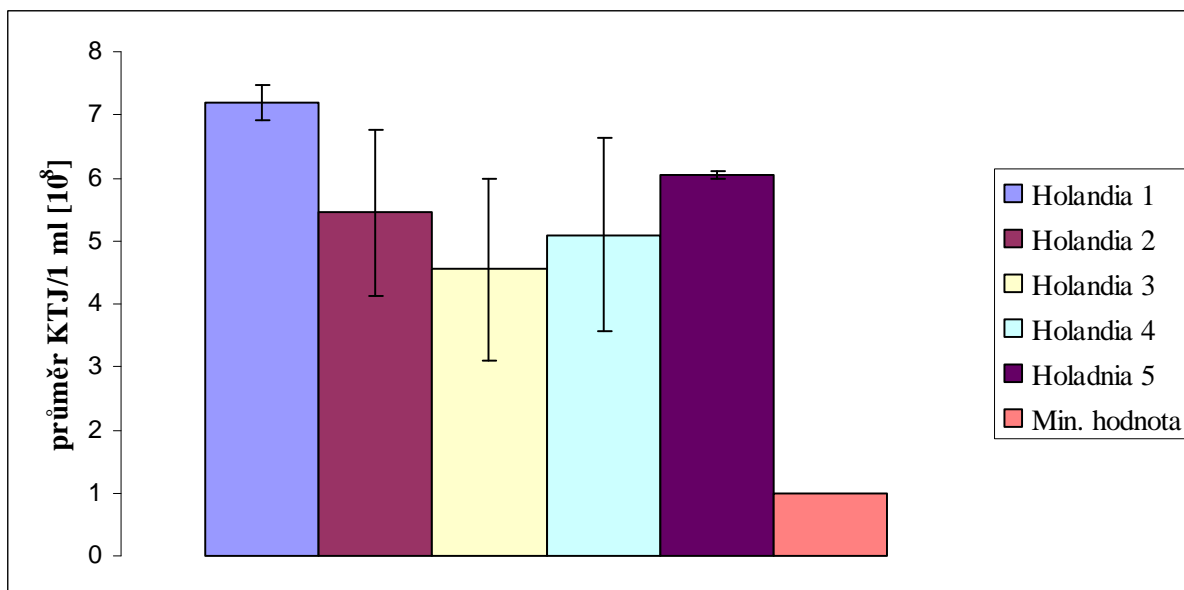
Graf 6.: Průměrný počet mléčných bakterií v Activii na MRS při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



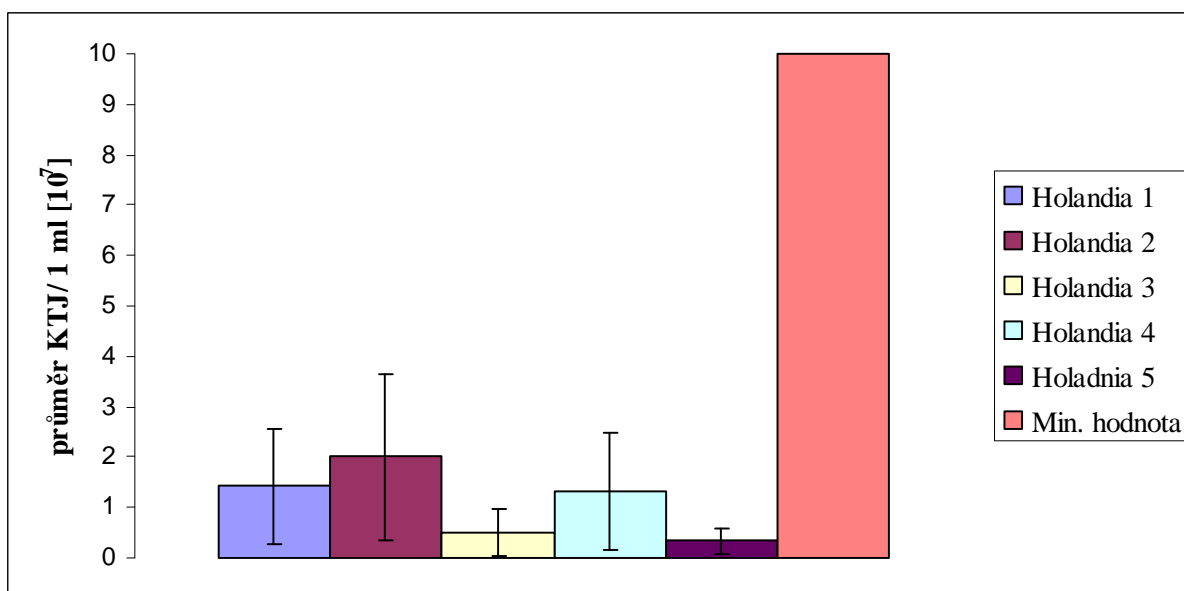
Graf 7.: Průměrný počet mléčných bakterií v Activii na MSMA při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



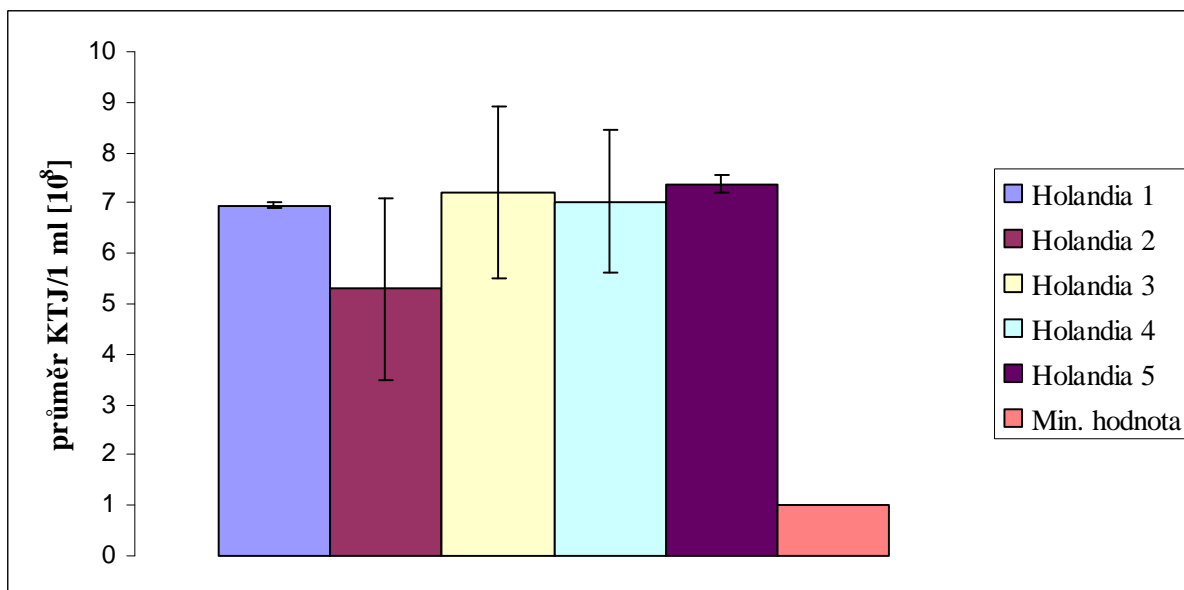
Graf 8.: Průměrný počet mléčných bakterií v Activii na MRS při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



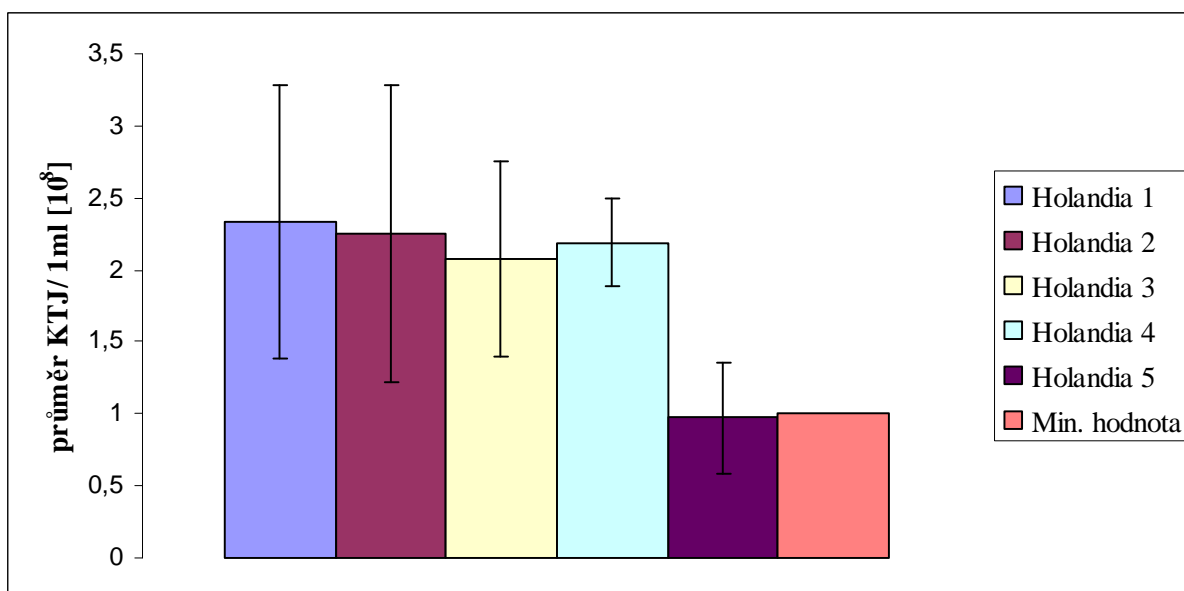
Graf 9.: Průměrný počet mléčných bakterií v Holandii na MSMA při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



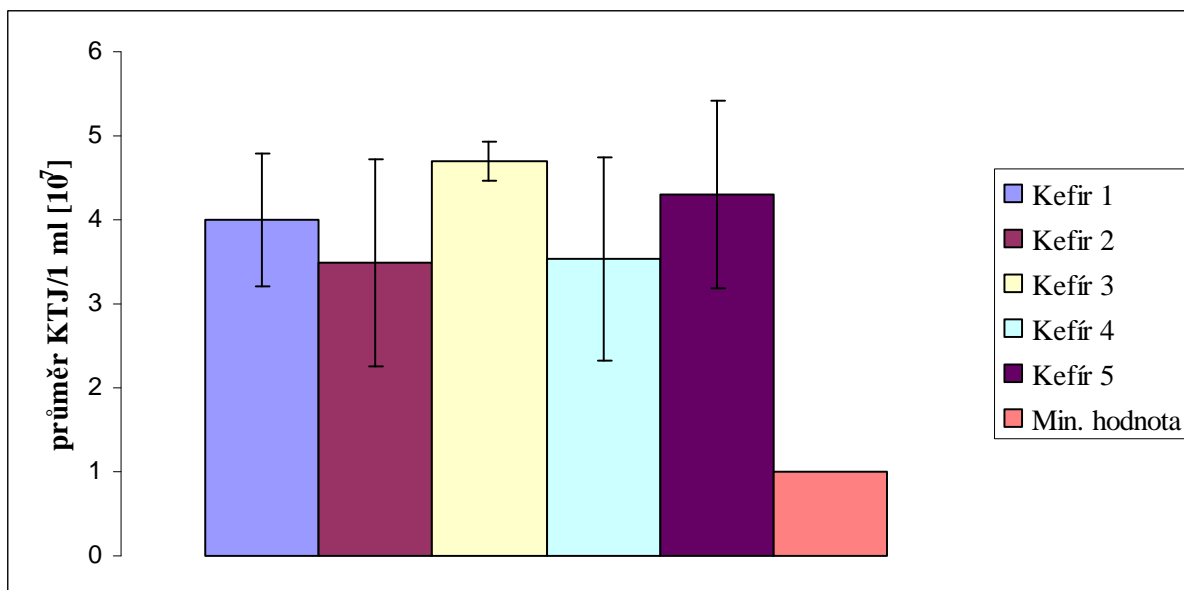
Graf 10.: Průměrný počet mléčných bakterií v Holandii na MRS při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



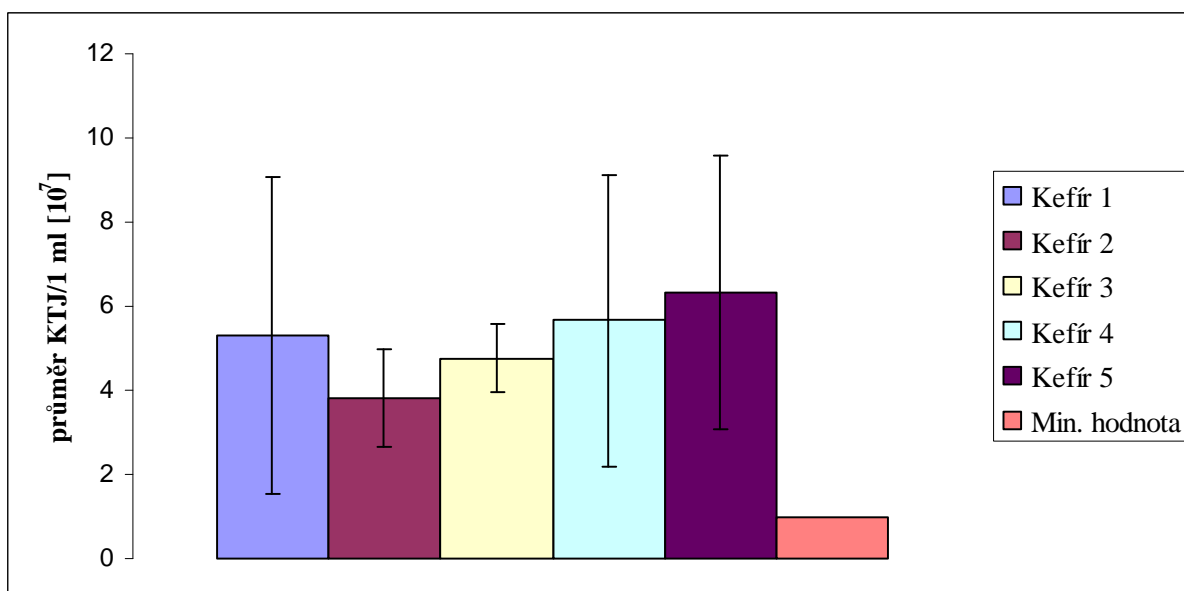
Graf 11.: Průměrný počet mléčných bakterií v Holandii na MSMA při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



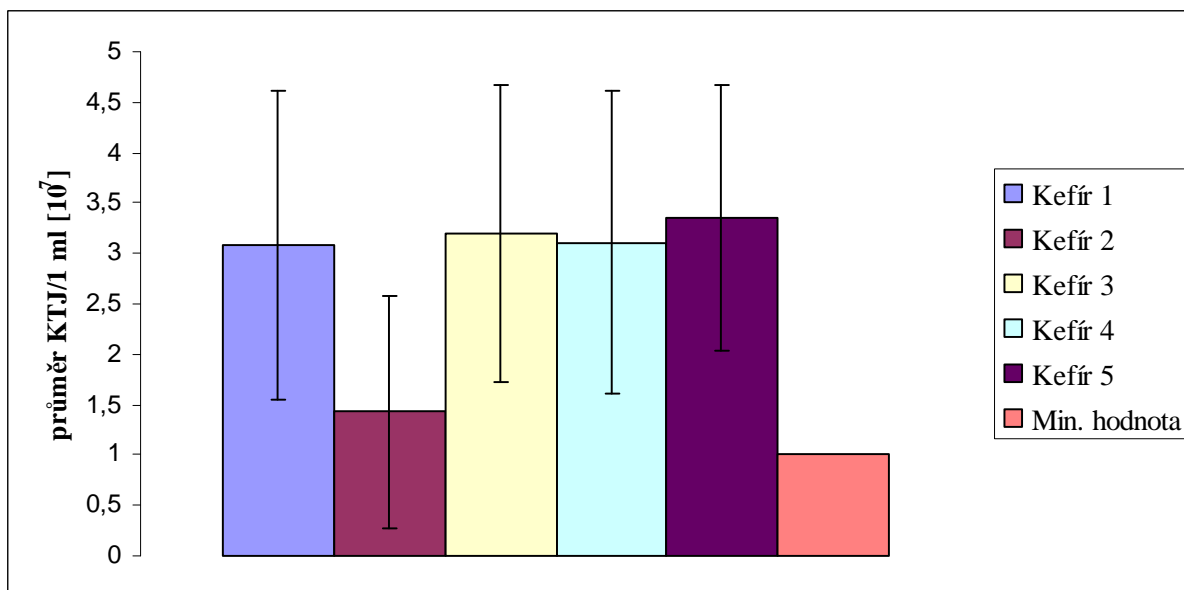
Graf 12.: Průměrný počet mléčných bakterií v Holandii na MRS při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



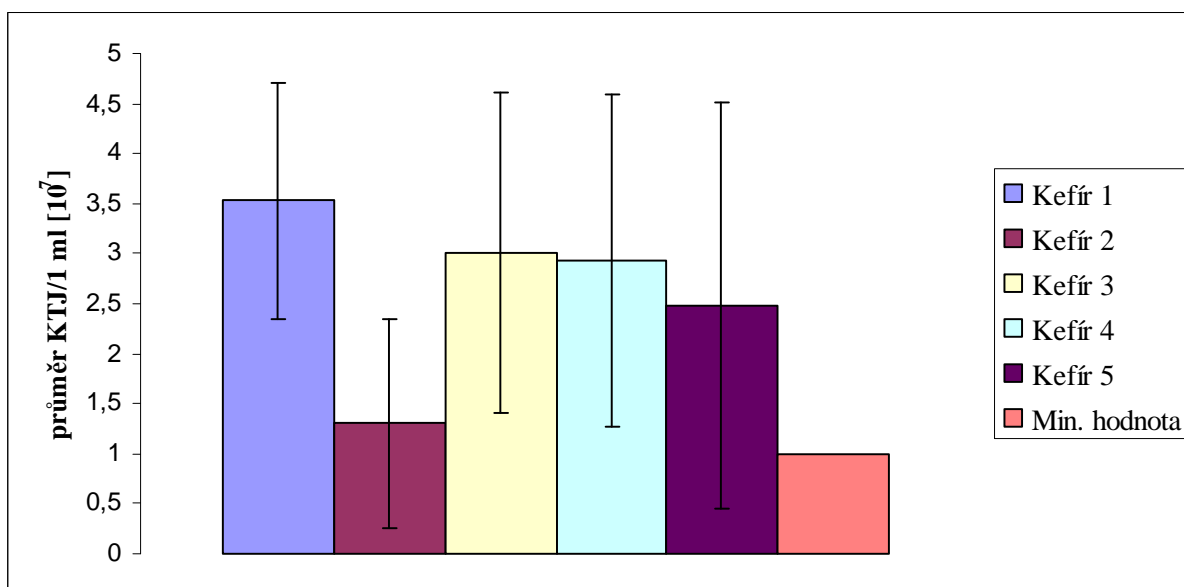
Graf 13.: Průměrný počet mléčných bakterií v Kefíru na MSMA při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



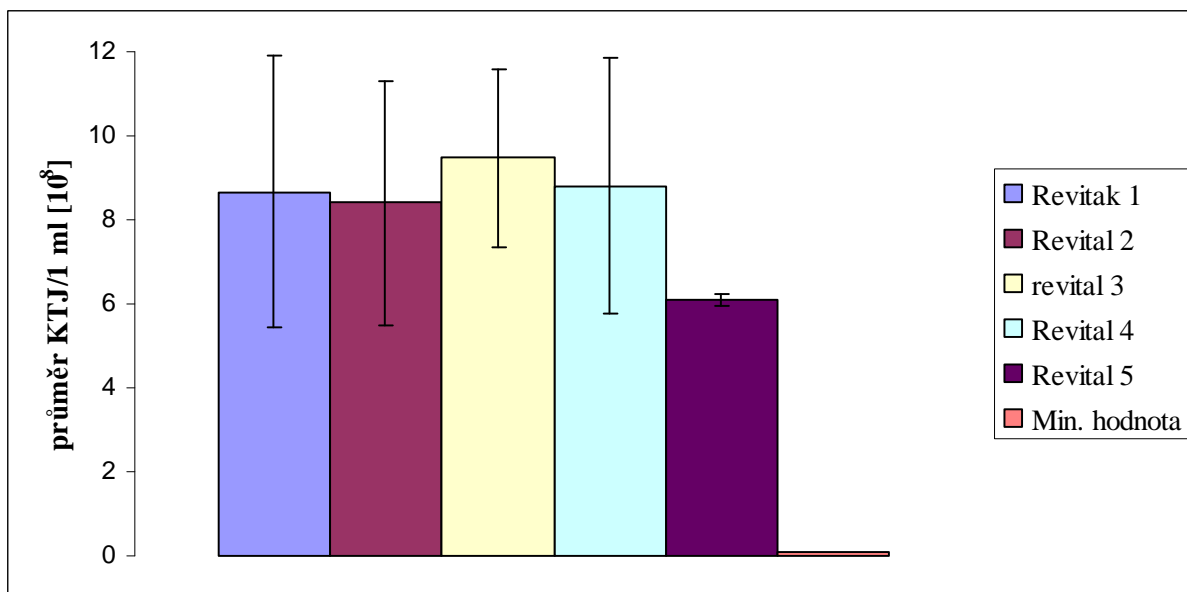
Graf 14.: Průměrný počet mléčných bakterií v Kefíru na MRS při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



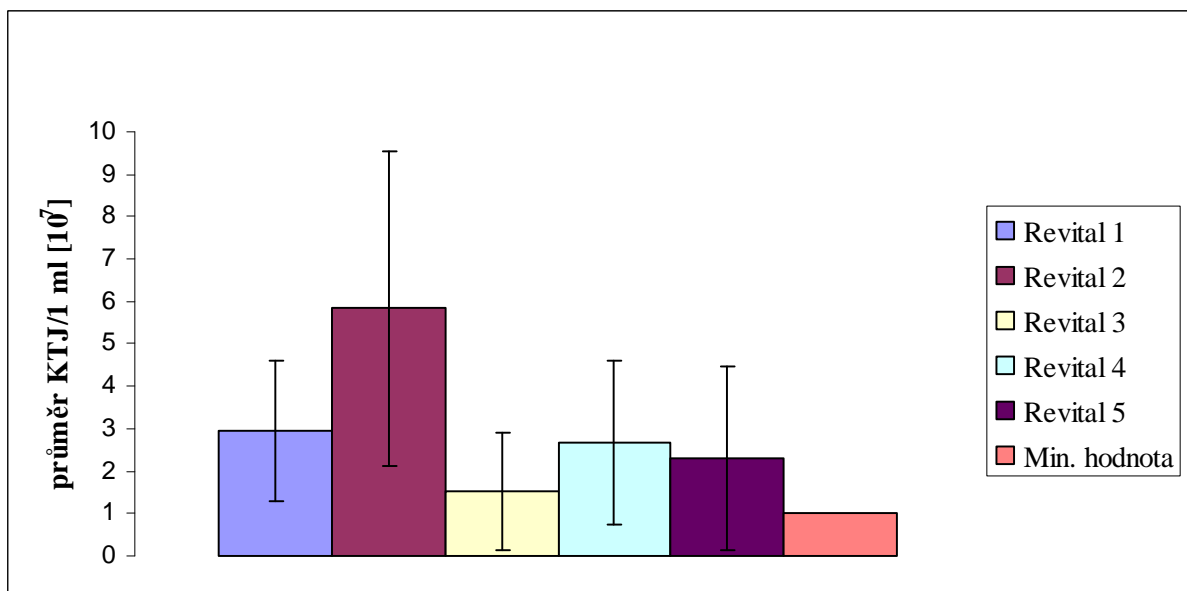
Graf 15.: Průměrný počet mléčných bakterií v Kefíru na MSMA při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.



Graf 16.: Průměrný počet mléčných bakterií v Kefíru na MRS při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.

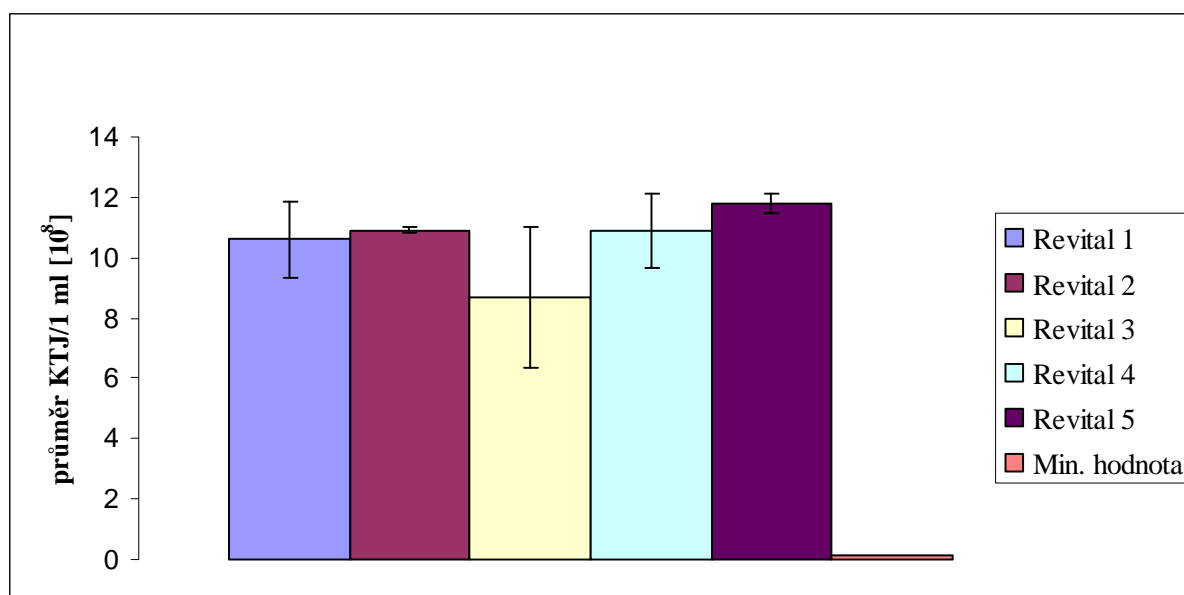


Graf 17.: Průměrný počet mléčných bakterií v Revitalu na MSMA při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.

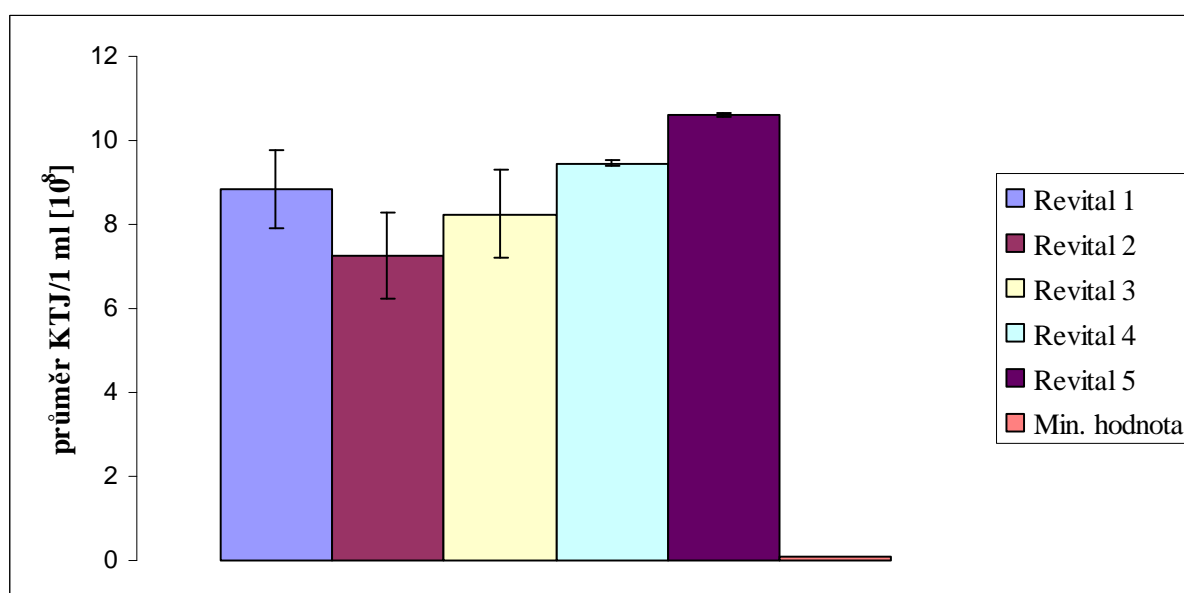


Graf 18.: Průměrný počet mléčných bakterií v Revitalu na MRS při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.

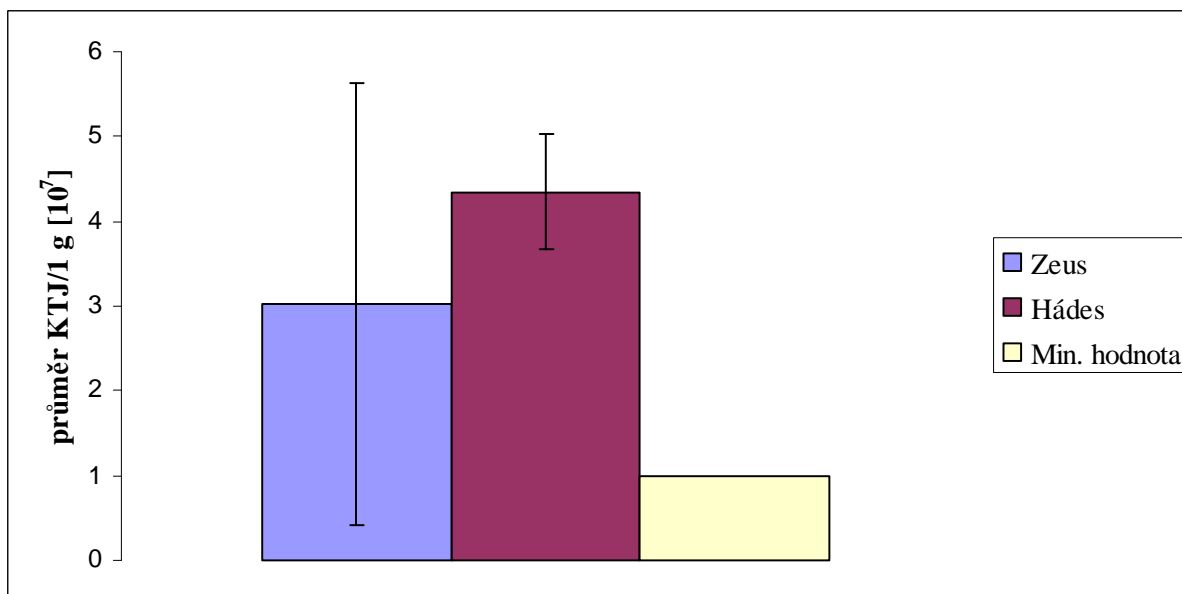




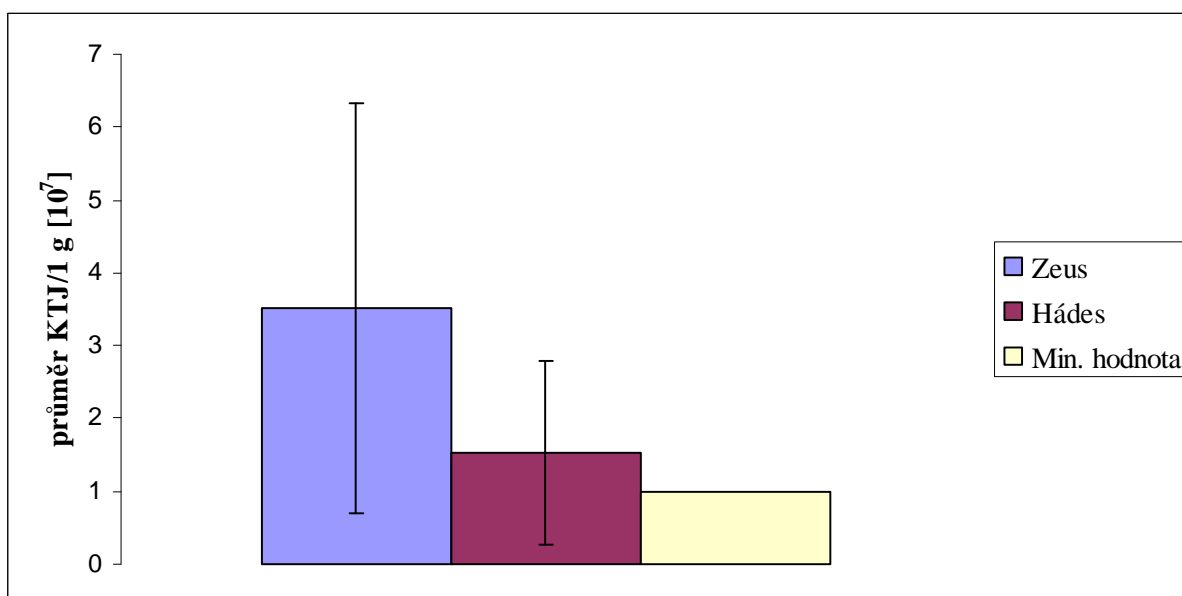
*Graf 19.: Průměrný počet mléčných bakterií v Revitalu na MSMA při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.*



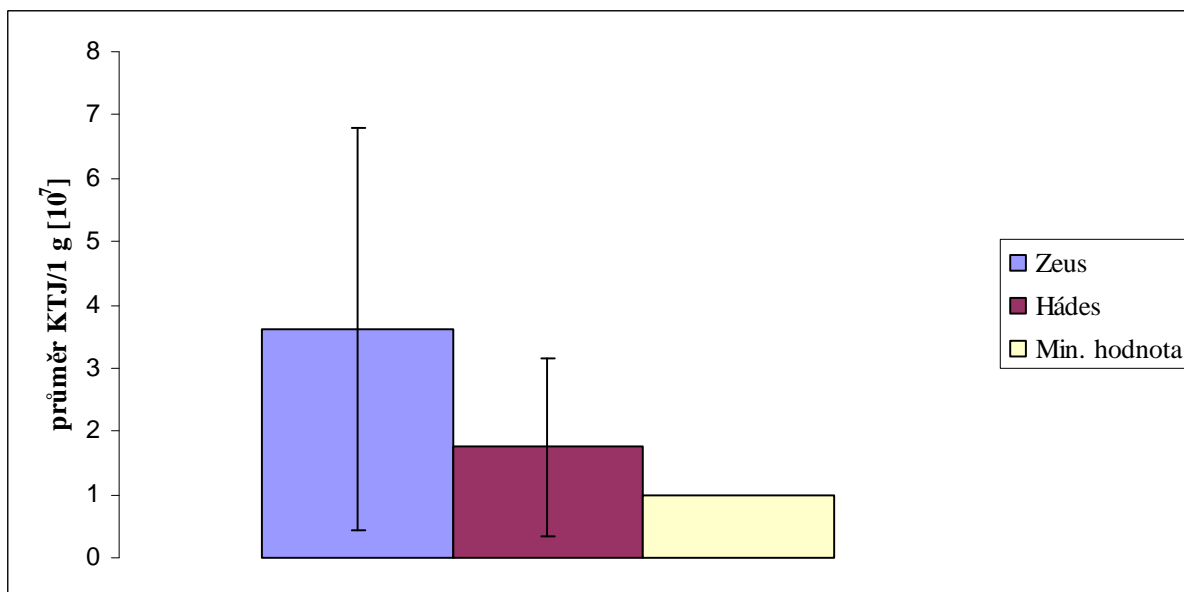
*Graf 20.: Průměrný počet mléčných bakterií v Revitalu na MRS při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky č. 77/2003 Sb.*



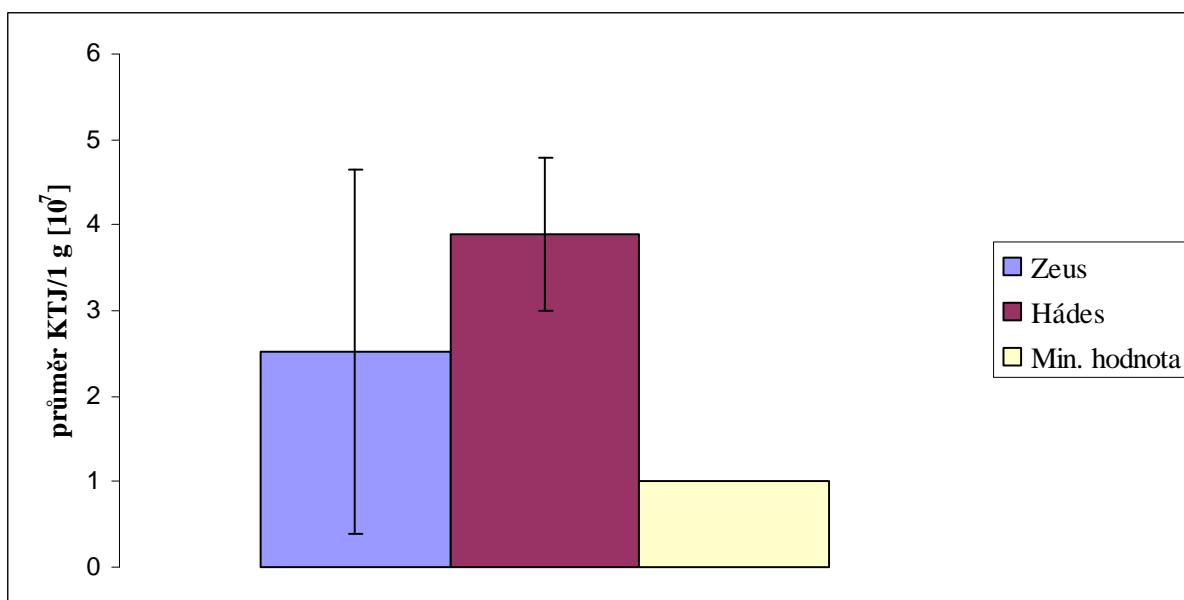
Graf 21.: Průměrný počet mléčných bakterií v Salámu na MSMA při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky pro mléčné výrobky



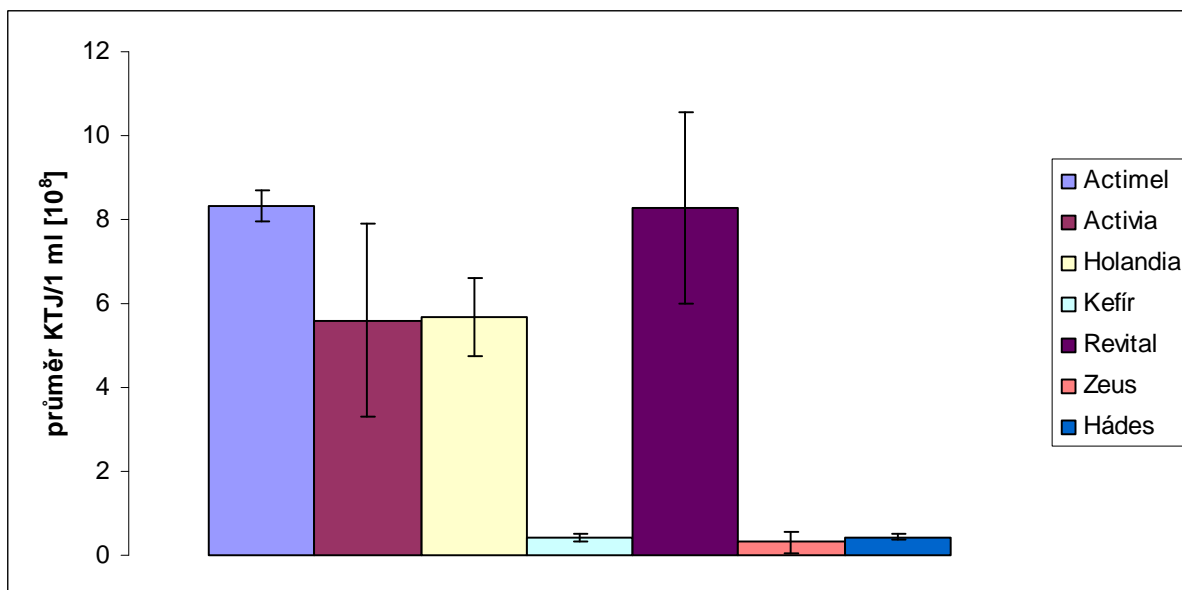
Graf 22.: Průměrný počet mléčných bakterií v Salámu na MRS při aerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky pro mléčné výrobky



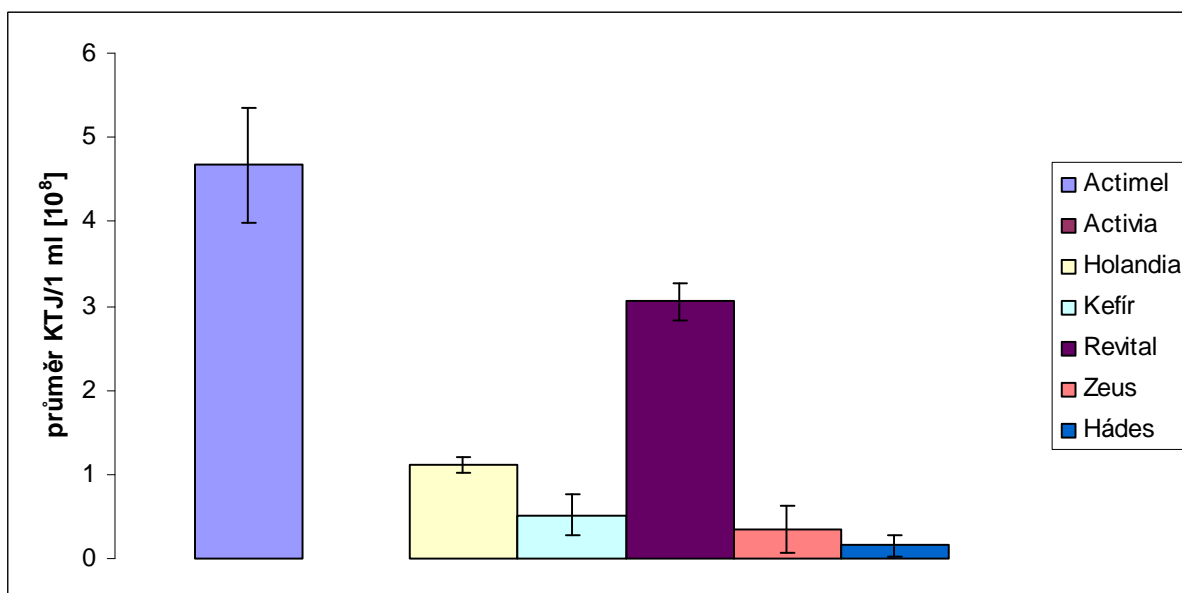
Graf 23.: Průměrný počet mléčných bakterií v Salámu na MSMA při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky pro mléčné výrobky



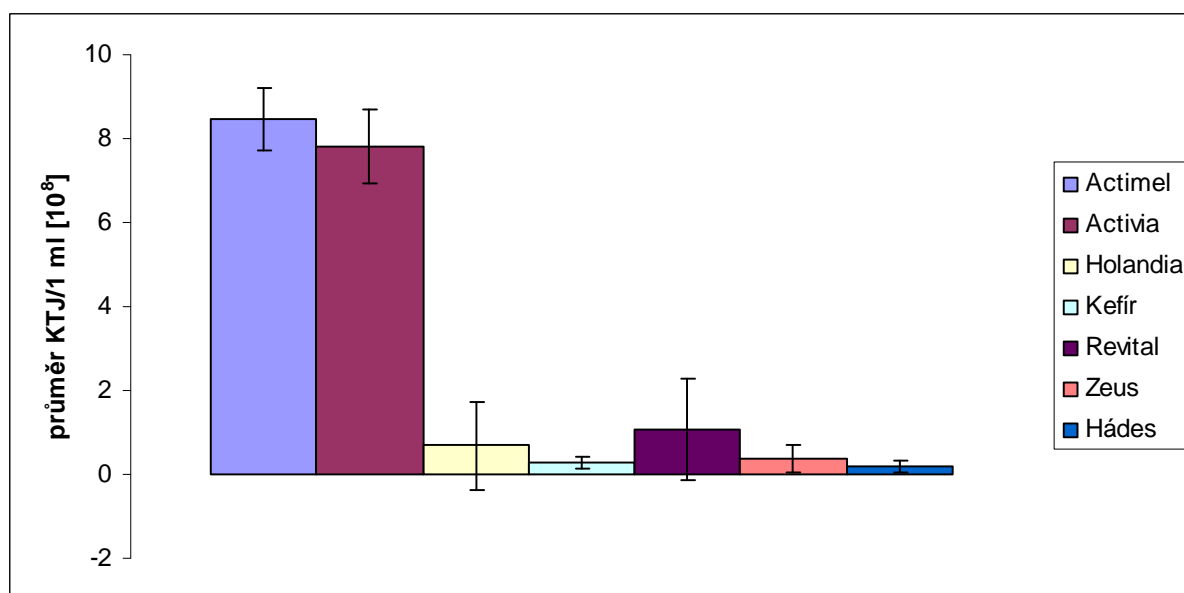
Graf 24.: Průměrný počet mléčných bakterií v Salámu na MRS při anaerobní kultivaci  
Min. hodnota = hodnota dle vyhlášky pro mléčné výrobky



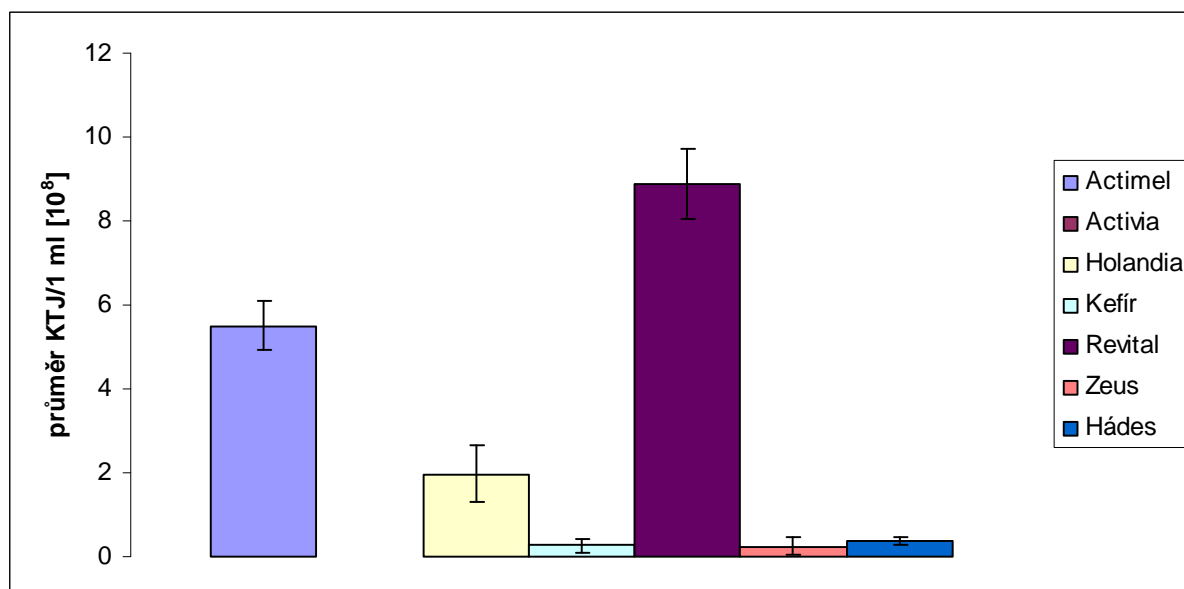
Graf 25.: Celkový počet mléčných bakterií na MSMA při aerobní kultivaci



Graf 26.: Celkový počet mléčných bakterií na MRS při aerobní kultivaci



Graf 27.: Celkový počet mléčných bakterií na MSMA při anaerobní kultivaci



Graf 28.: Celkový počet mléčných bakterií na MSMA při anaerobní kultivaci

## 5. ZÁVĚR

Jak již bylo mnohokrát řečeno, probiotika hrají významnou roli ve vývoji gastrointestinální mikroflóry, tedy i imunity a v celkovém stavu člověka. Výběr výrobků a správná konzumace je proto velmi důležitá.

Cílem této práce bylo kvantifikovat obsah mléčných bakterií ve vybraných výrobcích a celkové zhodnocení probiotických potravin na českém trhu.

Pro analýzu byly vybrány vzorky – jogurtové mléko Actimel, jogurt Activia, nápoj Revital active, Selský jogurt Holandia, Kefírové mléko nízkotučné s ABT kulturou a salám Zeus a Hádes. Všechny vzorky byly kultivovány na médiu MRS a MSMA, což jsou selektivní média pro mléčné bakterie, za aerobních a anaerobních podmínek při teplotě 37°C. Za aerobních podmínek rostou laktobacily, za anaerobních laktobacily a bifidobakterie. Po 48 hodinách byly spočítány vyrostlé kolonie (KTJ). Počet mikroorganismů byl stanoven v 1 ml (g) výrobku.

Při kvantitativním zjišťování celkového počtu mléčných bakterií byl nejvyšší počet zjištěn u mléčného nápoje firmy Danone (Actimel), kde se hodnoty blížily k řádu  $10^9$  ( $8,33 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml a  $8,47 \cdot 10^8$  KTJ/1 ml výrobku). Počet mléčných bakterií v řádu  $10^8$  byl zjištěn u výrobku firmy Olma (Revital active), Danone (Activia) a Holandia (Jogurt selský bílý).

U výrobku Mlékárny Valašské Meziříčí (Kefírové mléko s ABT kulturou) se hodnoty mléčných bakterií pohybovaly v řádu  $10^7$ .

Nejméně bakterií (v řádu  $10^6$  -  $10^7$ ) se nacházelo ve výrobku Masny Kmotr (salám Zeus a Hádes).

Přesto, že se hodnoty u jednotlivých výrobků lišily, všechny splňovaly požadavky dané vyhláškou, tedy počet mléčných bakterií v rozmezí  $10^7$  -  $10^8$  KTJ/1 ml (g).

Probiotických výrobků na trhu stále přibývá, je tedy pouze na nás, jakému dáme přednost. Ve skutečnosti jsou výrobky s nejvyšším obsahem probiotických bakterií potřeba především v případě výrazného narušení rovnováhy střevní mikroflóry, například po léčbě antibiotiky, ale jinak podle odborníků stačí jogurty či jiné zakysané mléčné výrobky.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GORNER, F., VALÍK, L.: *Aplikovaná mikrobiologie poživatin*, 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004, ISBN: 80-967064-9-7
- [2] Rougier s.r.o.: *Co jsou to probiotika?* [online], 2004, [cit. 13.2.2008], dostupné z: <[http://www.rougier.cz/obecne\\_info.html](http://www.rougier.cz/obecne_info.html)>
- [3] BORRIELLO, P., HAMMES, W. P., HOLZAPFEL, W., MARTEAU, P., SCHREZENMEIER, J., VAARA, M., VALTONEN, V.: Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2003, vol. 15, no. 36, pp. 775-780, ISSN: 1058-4838
- [4] STILES, M. E., HOLZAPFEL, W. H.: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International journal of food microbiology*, 1997, vol. 36, no. 1, pp. 1-29, ISSN: 0168-1605
- [5] KAPLICE, E., FITZGERALD, G. F.: Food fermentations: role of microorganism in food production and preservation, *International journal of food microbiology*, 1999, vol. 15, no. 50, pp. 131-49, ISSN: 0168-1605
- [6] WOOD, B. J. B., HOLZAPFEL, W. H.: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic Press and Professional, 1995, pp. 327-367, ISBN: 2XDT-SUX-F671
- [7] HOLZAPFEL, W.: Lactic acid bacteria within the context of safety, functionality and novel applications, *Acta Alimentaria*, 2007, vol. 36, no. 1, pp. 3-6, ISSN: 0129-3006
- [8] KLAZAN, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*, 1. vyd. Praha: Galén 2005, ISBN: 80-7262-314-9
- [9] COLLINS, M. D., SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., WALLBANKS, S.: Taxonomic Studies on Some Leuconostoc-like Organisms from Fermented Sausages: Description of a New Genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides Group of Species., *Journal of Applied Microbiology*, 1993, vol. 75, no. 6, pp. 595-603, ISSN: 0021-8847
- [10] BJÖRKROTH, J., HOLZAPFEL, W.: Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella, *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 2004, ISBN: 978-0-387-25494-4
- [11] CHMELÁŘ, D.: NRL pro anaerobní bakterie, Státní zdravotní ústav, [online] 2002, [cit. 28.1.2008], dostupné z: <<http://www.szu.cz/cem/zpravy/zpr1102/carnoba.htm>>
- [12] STÁVEK, R.: Genetické výzkumy nabízejí vinařům naději, podle časopisu *Decanter*, [online], 2002, prosinec [cit. 15.2.2008], dostupné z: <<http://www.svetvina.cz/clanek.php?id=197>>

- [13] LOURENS-HATTINGH, A., VILJOEN, B. C.: Yogurt as probiotic carrier food, *International Dairy Journal*, 2001, vol. 11, no. 1-2, pp. 1–17, ISSN: 0958-6946
- [14] CAHN, D. R.: Über die nach Gram färbbaren Bacillen des Säulingsstuhles (Bacilli of infant stools stainable according to Gram) I. Abteilung Originale, *Centralblatt für Bakteriologie*, 1901, vol. 30 ,pp. 721-726, ISSN: 1555-1431
- [15] ZBOŘIL, V.: Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů, *Alergie*, 2004, roč. 6, č. 3, s. 16-19, ISSN 1212-687X
- [16] FULLER, R.: Probiotics in man and animals, *Journal of applied bakteriology*, 1989, vol. 66, no. 5, pp. 365-378, ISSN: 0021-9193
- [17] LILLY, D. M., STILLWELL, R. H.: Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms, *Science*, 1965, vol. 147, no. 3659, pp. 747 – 748, ISSN: 0193-4511
- [18] FULLER, R.: *Probiotics: the scientific basis*, 1<sup>st</sup> ed. London: Springer, 1992, 416 s. ISBN: 0-412-40850-3
- [19] SAARELA, M., MOGENSEN, R., FONDEN, R., MATTO, J., MATTILA-SANDHOLM, T.: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, 2000, vol. 84, no. 3, pp. 197–215, ISSN: 0168-1656
- [20] ČIHÁK, R.: *Anatomie 2*, 2. vyd. Praha: Grada, 2002, ISBN: 80-247-0143-X
- [21] GOMES, A. M. P., MALCATA, F. X.: Trends Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, *Food & technology*, 1999, vol. 10, no. 4-5, pp. 139-157, ISSN: 0924-2244
- [22] TŮMA, Š.: Probiotika [online]. 2007, poslední aktualizace 2.9.2007, [cit. 3.2.2008], dostupné z: <<http://derewi.blog.cz/0709/probiotika>>
- [23] KREJSEK, J., KUDLOVÁ, M., KOLÁČKOVÁ, M., NOVOSAD, J.: Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita, *Pediatric pro praxi*, 2007, roč. 2007, č. 3, s. 156–162, ISSN: 1213-0494
- [24] Gaelle Quillien: *Probiotics*, Institut National de la Recherche Agronomique, France: Flair flow 4, 2001, 9 s. ISBN: 2-7380-1002-4
- [25] ŠVESTKA, T.: Mikroflóra trávicího traktu a probiotika, *Pediatric pro praxi*, 2008, roč. 2008, č. 1, s. 34-35, ISSN: 1213-0494
- [26] SZAJEWSKA, H., KOTOWSKA, M., MRUKOWICZ, J. Z., ARMANSKA, M., MIKOLAJCZYK, W.: Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants, *The Journal of Pediatrics*, 2001, vol. 138, no. 3, pp. 361-365, ISSN: 1098-4275



- [27] SZAJEWSKA, H., MRUKOWICZ, J. Z.: Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhoea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials, *The Journal of Pediatrics*, 1999, vol. 135, no. 5, pp. 564-568, ISSN: 1098-4275
- [28] LODINOVÁ-ŽÁDNÍKOVÁ, R.: Probiotika v pediatrii: snížení rizika nosokomiálních infekcí perorálním osídlením probiotickým kmenem *E. coli* po narození a jeho vliv na frekvenci opakovaných infekcí a alergií po 10 a 20 letech, *Alergie*, 2002, roč. 4., č. 4, s. 275-280, ISSN: 1212-3536
- [29] BLACK, F. T.: Prophylactic efficacy of lactobacilli on travelers' diarrhoea, *Travel Medicine*, 1989, vol.: 7, pp. 333-335, ISSN: 1477-8939
- [30] OKSANEN, P. J., SALMINEN, S., SAXELIN, M., et al.: Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus GG*, *Annals of Medicine*, 1990, vol. 22, pp. 53-56, ISSN: 0003-4819
- [31] CREMONINI, F., DI CARO, S., NISTA, E. C., et al.: Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2002, vol. 16, no. 8, pp. 1461-1467, ISSN: 0269-2813
- [32] D'SOUZA, A. L., RAJKUMAR, C. R., COOKE, J., BULPITT, C. J.: Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis, *British Medical Journal*, 2002; vol. 324, no. 7350, pp. 1361-1364, ISSN: 0966-6494
- [33] VOKURKA, M., HUGO, J., a kolektiv: *Velký lékařský slovník*, 4. vyd. Praha: Maxdorf Jessenius, 2002, ISBN: 80-7345-037-2
- [34] GUSLANDI, M., GIOLLO, P., TESTONI, P. A.: A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2003, vol. 15, no. 6, pp. 697-698, ISSN: 1522-8037
- [35] GUSLANDI, M., MEZZI, G., SORGI, M., TESTONI, P. A.: *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease, *Digestive Diseases and Sciences*, 2000, vol. 45, no. 7, pp. 1462-1464, ISSN: 0163-2116
- [36] KLENER, P., et al.: *Vnitřní lékařství*, 3. vyd., Praha: Galén/Karolinum, 2006, ISBN: 807262430X
- [37] LUKÁŠ, M.: Syndrom dráždivého tračníku, *Interní medicína pro praxi*, 2007, roč. 2007, č. 12., s. 24-25, ISSN: 1212-7299
- [38] FRIC, P., ZAVORAL, M.: The effect of non-pathogenic *Escherichia coli* in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2003, vol. 15, no. 3, pp. 313-5, ISSN: 0954-691X

[39] PETR, P., KALOVÁ, H., SOUKUPOVÁ, A.: *Helicobacter pylori* infection, [online]. 2004, poslední revize 13.10.2004 [cit. 15.3.2008], dostupné z: <[http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/21413\\_22401.html](http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/21413_22401.html)>

[40] CREMONINI, F., DI CARO, S., COVINO, M., et al.: Effect of different probiotic preparations on anti- *helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study, *The American journal of gastroenterology*, 2002, vol. 97, no. 11, pp. 2744-2749, ISSN: 0002-9270

[41] LIU, Q., DUAN, Z. P., et al.: Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis, *Hepatology*, 2004, vol. 39, no. 5, pp. 1441-1449, ISSN: 1092-8472

[42] BOČA, M., VYSKOČIL, M., MIKULECKÝ, M., et al.: Komplexná liečba chronickej hepatálnej encefalopatie doplnená probiotikom, *Časopis Lékařů českých*, 2004, roč. 2004, č. 143, s. 324-328, ISSN: 0008-7335

[43] BRŮHA, R., MAREČEK, Z., PETRTÝL, J., KALÁB, M.: Jaterní encefalopatie – komplikace jaterní cirhózy, *Vnitřní lékařství*, 2002, roč. 48, no. 11, s. 1025 - 1030, ISSN: 0042-773X

[44] LATA, J., JURÁNKOVÁ, J., PŘÍBRAMSKÁ, V., et al.: Vliv podání *Escherichia coli* Nissle (Mutaflor) na střevní osídlení, endotoxemii, funkční stav jater a minimální jaterní encefalopatii u nemocných s jaterní cirhózou, *Vnitřní lékařství*, 2006, roč. 52, č. 3, s. 215-219, ISSN: 0042-773X

[45] WU, C. D., LI, M. Z., CHEN, C. L., et al.: Endotoxin-induced liver injury and plasma tumor necrosis factor alfa, interleukin 6 level changes in rabbits, *Chinese Journal of Digestive Diseases*, 1995, vol.15, pp. 256-258, ISSN: 1443-9611

[46] MEDINA, J., FERNÁNDEZ-SALAZAR, L. I., GARCÍA-BUEY, L., MORENO-OTERO, R.: Approach to the Pathogenesis and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis, *Diabetes Care*, 2004, vol. 27, no. 8, pp. 2057-2066, ISSN: 0149-5882

[47] FERRER, J.: Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors, *International journal of gynaecology and obstetrics*, 2000, vol. 71, no. 1, pp. 21-27, ISSN: 1470-0328

[48] OCANA, V. S., NADER-MARCIAS, M. E.: Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability, *British journal of biomedical science*, 2002, vol. 59, no. 4, pp. 183-190, ISSN: 0967-4845

[49] MASTROMARINO, P., BRIGIDI, P., MACCHIA, S., et al.: Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets, *Journal of Applied Microbiology*, 2002, vol. 93, no. 5, pp. 884-893, ISSN: 1364-5072

- [50] BRUCE, A. W., REID, G.: Probiotics and the urologist, *The Canadian journal of urology*, 2003; vol. 10, no. 2, pp. 1785-1789, ISSN: 1195-9479
- [51] BRADY, L. J., GALLAHER, D.D., BUSTA, F. F.: The roke of probiotic cultures in the prevention of colon cancor, *The Journal of nutrition*, 2000, vol. 130, no. 2, pp. 410-414, ISSN: 0022-3166
- [52] WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G., POOL-ZOBEL, B. L.: Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer, *The American journal of clinical nutrition*, 2001, vol. 73, no. 2, pp. 451-455, ISSN: 0002-9165
- [53] HIRAYAMA, K., RAFTER, J.: The role of probiotic bakteria in cancer prevention, *Microbes and infection*, 2000, vol. 2, no. 6, pp. 681-686, ISSN: 1286-4579
- [54] KASSIE, F., RABOT, S., KUNDI, M., CHABICOVSKY, M.: Intestina microflora plays a crucial role in the genotoxicity of the cooked food mutagen2-amino-3-mehylimidazo[4,5-f]quinoline; *Carcinogenesis*, 2001, vol. 22, no. 10, pp. 1721-1725, ISSN: 0143-3334
- [55] KADLEC, P.: *Technologie potravin I*, 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, ISBN: 80-7080-509-9
- [56] ZBOŘIL, V.: *Mikroflóra trávicího traktu - klinické souvislosti*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005, ISBN: 80-247-0584-2
- [57] SILBERNAGL, S., DESPOPOULOS, A.: *Atlas fyziologie člověka*, 6. vyd. Praha: Grada, 2004, ISBN: 80-247-0630-X
- [58] KOUKAL, M.: Co jsou mlčenliví vrazi v potravinách?, *Revue objevů, vědy, techniky a lidí 21. století*, 2007, roč. 7, č. 6, s. 12-13, ISSN: 1214-1097
- [59] KADLEC, P., a kolektiv: *Technologie potravin II*, 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, ISBN: 80-7080-510-2
- [60] STIBŮREK, O., PŘÍBRAMSKÁ, V., LATA, J.: Místo probiotik v léčbě (nejen) gastrointestinálních chorob, *Interní medicína pro praxi*, 2009, roč. 2009, č. 11, s. 25-29, ISSN: 1212-7299
- [61] HOLM, F.: Syntetická zpráva: Průmysl a obchod (SME1), Gut health, Evropský projekt Flair Flow souhrnná zpráva o vlivech pro a prebiotik. [cit. 11.2.2008]. Dostupné z <<http://flairflow4.vscht.cz>>
- [62] Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb.
- [63] HEKMAT, S., REID, G.: Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt, *Nutrition Research*, 2006, vol. 26, no. 4, pp. 163– 166, ISSN: 0271-5317

- [64] PETR, P., KALOVÁ, H., DOLISTA, J., SOUKUPOVÁ, A., VELIKOVSKÝ, Z.: *Food in the third millenium*, [cit. 29.10.2009] Dostupné z: [http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/verzdrav/clenove/petr/studijni\\_texty/texty\\_KFT05/11Strava.doc](http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/verzdrav/clenove/petr/studijni_texty/texty_KFT05/11Strava.doc)
- [65] BAOYIFIT, G., KULEAOAN, H., KARAHANA, G.: Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame, *Journal of Industrial Microbiol Biotechnol*, 2006, vol. 33, no. 9, pp. 796–800, ISSN: 1367-5435
- [66] ADRIANO, G. C., ADRIANE E., ANTUNES, B., SOUSA, A. L., FARIA, J. A. F., SAAD, M. I. S.: Ice-cream as a probiotic food carrier, *Food Research International*, 2009, vol. 42, no. 9, pp. 1233–1239, ISSN: 0963-9969
- [67] AKIN, M. B., AKIN, M. S., KIRMACI, Z.: Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream, *Food Chemistry*, 2007, vol. 104, no. 1, pp. 93–99, ISSN: 0308-8146
- [68] HOMAYOUNI, A., AZIZI, A., EHSANI, M. R., YARMAND, M. S., RAZAVI, S. H.: Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream, *Food Chemistry*, 2008, vol. 111, no. 1, pp. 50–55, ISSN: 0308-8146
- [69] RAGON-ALEGRO, L. C., ALARCON ALEGRO, J. O. H., CARDARELLI, H. R., CHIH CHIU, M., ISAY SAAD, S. M.: Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse, *LWT - Food Science and Technology*, 2007, vol. 40, no. 4, pp. 669–675, ISSN: 0023-6438
- [70] HARRIGAN, W. F.: *Laborathory methods*, 3<sup>nd</sup> ed. London: 1998, ISBN: 0-12-326043-4
- [71] VOTAVA, M. : *Lékařská mikrobiologie speciální*, 1. vad. Brno: Neptun, 2001, ISBN-80-902896-6-5
- [72] MARAGKOUidakis, P. A., ZOUMPOPOULOU, G., MIARIS, CH., KALANTZOPOULOS, G., POT, B., TSAKALIDOU, E.: Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products, *International Dairy Journal*, 2006, vol. 16, no. 3, pp. 189–199, ISSN: 0958-6946
- [73] GUEIMONDE, M., DELGADO, S., MAYO, B., RUAS-MADIEDO, P., MARGOLLES, A., REYES-GAVILAN, C. G.: Viability and diversity of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium populations included in commercial fermented milks, *Food Research International*, 2004, vol. 37, pp. 839–850, ISSN: 0963-9969
- [74] HILDE, M., TREIMO, J., NARVHUS, J. A.: Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk, *International Dairy Journal*, 2005, vol. 15, no. 10, pp. 989–997, ISSN: 0958-6946

[75] REUTER, G., KLEIN, G., GOLDBERG, M.: Identification of probiotic cultures in food samples, *Food Research International*, 2002, vol. 35, no. 2, pp. 117–124, ISSN: 0963-9969

[76] KWON, H. H. HHHJL, YANG, E., LEE, S., YEON, S., KANG, B., KIM, T.: Rapid identification of potentially probiotic Bifidobacterium species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA, *FEMS Microbiology Letters*, 2005, vol. 250, no. 1, pp. 55–62, ISSN: 1466-5026

[77] RITTICH, B.: Přednášky z bioanalytických metod, 2009

[78] KLEIN, G, PACK, A, BONAPARTE, C, REUTER, G.: Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 1998, vol. 26, no. 41, pp. 103-125, ISSN: 0168-1605

[79] ŠPANOVÁ, A.: Přednášky z molekulární biotechnologie, 2009

[80] LAHTINEN, J. S., GUEIMONDE, M., OUWEHAND, A. C., REINIKAINEN, J. P., SALMINEN, S. J.: Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product, *Food Microbiology*, 2006, vol. 23, no. 6, pp. 571–577, ISSN: 0740-0020

[81] COEURET, V., GUEGUEN, M., VERNOUX, J. P.: Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products, *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 97 , no. 2, pp. 147– 156, ISSN: 0168-1605

[82] COEURET, V., DUBERNET, S., BERNARDEAU, M., GUEGUEN, M., VERNOUX, J. P.: Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products, *LeLait*, 2003, vol. 83, pp. 269–306, ISSN: 0023-7302

[83] BUREŠOVÁ, K., BURDYCHOVÁ, R. : Detection and monitoring of probiotic microorganisms in fermented milk products. In *MendelNET'2008 Agro. Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. Brno: Mendelova Zemědělská a Lesnická Univerzita v Brně, 2008, s. 93. ISBN 978-80-7375-239-2

[84] RADA, V., VLKOVÁ, E.: Vývoj selektivního média pro stanovení bifidobakterií v mléčných výrobcích, *Katedra mikrobiologie a biotechnologie, ČZU Praha* [online], 2003 [cit. 14.11.2009], dostupné z: <<http://biomikro.vscht.cz/trest/docs/sbornik/2003.pdf>>

[85] VŠCHT, [online], [cit. 12.11.2009], dostupné z: <<http://www.vscht.cz/kch/galerie/mleko.htm>>

[86] Danone a.s., [online], aktualizace 10.04.2008, [cit. 18.3.2008], dostupné z: <<http://www.danone.cz>>

[87] Danone a.s., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.activia.cz>>

- [88] Olma a.s., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.olma.cz>>
- [89] Meggle s.r.o., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.meggle.cz>>
- [90] Laktos a.s., [online], aktualizace 28.12.2007, [cit. 18.3.2008], dostupné z: <<http://www.laktos.cz>>
- [91] Zott s.r.o., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.zott.cz>>
- [92] Mlékárna Kunín a.s., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.mlekarna-kunin.cz>>
- [93] Mlékárna Valašské Meziříčí s.r.o., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.mlekarna-valmez.cz>>
- [94] Madeta a.s., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.madeta.cz>>
- [95] Společnost Hollandia, [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.hollandia.cz>>
- [96] Rajo, [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.rajo.sk>>
- [97] Ekomilk, [online], [cit. 22.2.2010], dostupné z: <<http://www.ekomilk.cz/>>
- [98] Bohušovická mlékárna, [online], [cit. 22.2.2010], dostupné z: <<http://www.accom.cz>>
- [99] Nestlé Česko s.r.o., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.nestle.cz>>
- [100] Kmotr a.s., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.masna.cz>>
- [101] Firma Klas, [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.klas.cz>>
- [102] Firma Merk, [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.bion3.cz>>
- [103] [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.nejzdravi.cz/nutra-bona-symba.p.aspx>>
- [104] Pharma Agency s.r.o., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.dophilus.cz>>
- [105] Společnost DrNatura.com Inc., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.drnatura.cz>>
- [106] Firma ASP CZECH s.r.o., [online], [cit.18.3.2008], dostupné z: <<http://www.aspczech.cz>>
- [107] Probian [online], [cit. 6.4.2008], dostupné z: <<http://www.probian.cz>>

[108] Společnost pro probiotika a prebiotika, [online], [cit. 6.4.2008], dostupné z:  
<<http://www.probiotika-prebiotika.cz/cs/dokumenty/>>

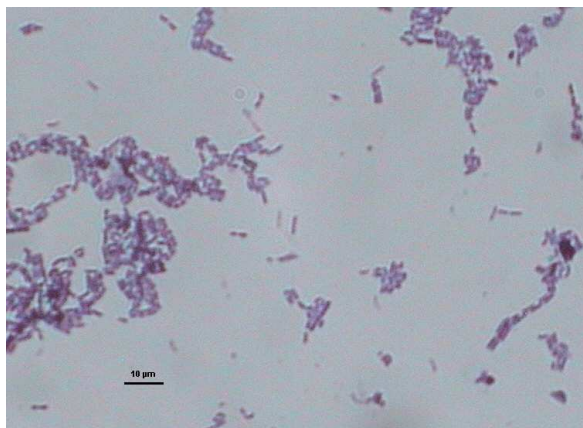
## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

GIT	gastrointestinální trakt
Subsp.	subspecies
Sp.	species
MJE	minimální jaterní encefalopatie
EEG	elektroencefalograf
KTJ	kolonie tvořící jednotku
VSL#3	směsné probiotikum
TPY	typ živné půdy
MRS	de Man, Rogosa and Sharp
MSMA	modified skim milk agar
BSM	bifidus selektivní agar
FISH	fluorescenční hybridizace in situ
RAPD	náhodná amplifikace polymorfni DNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFGE	pulzní gelová elektroforéza
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným

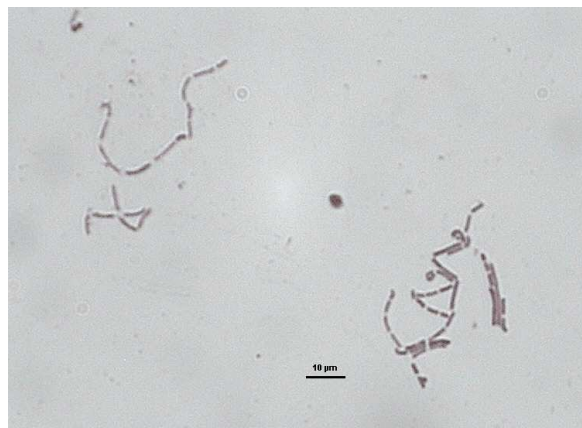


## 8. PŘÍLOHY

### 8.1. Preparáty Gramovo barvení - Actimel



*Actimel aerobní kultivace*

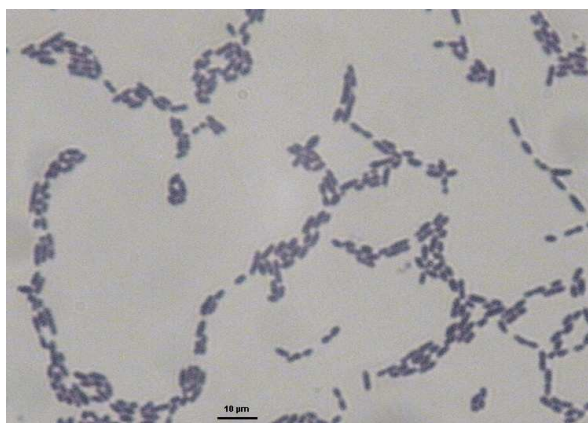


*Actimel anaerobní kultivace*

### 8.2. Preparáty Gramovo barvení - Activia

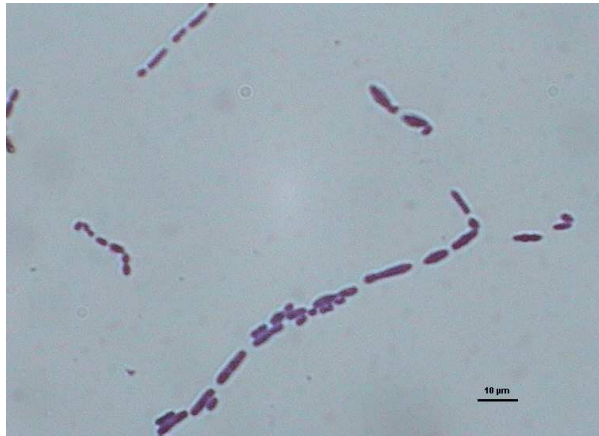


*Activia aerobní kultivace*

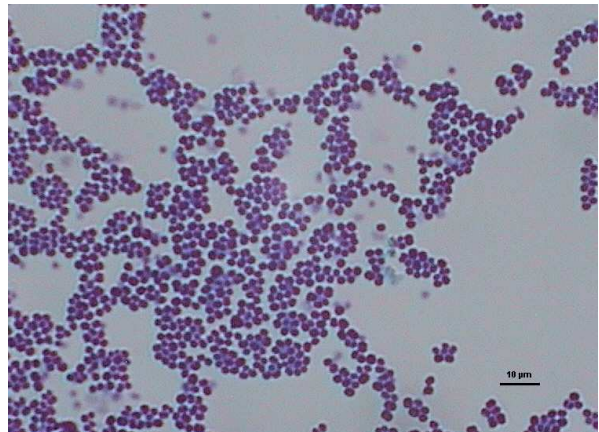


*Activia anaerobní kultivace*

### 8.3. Preparáty Gramovo barvení - Holandia

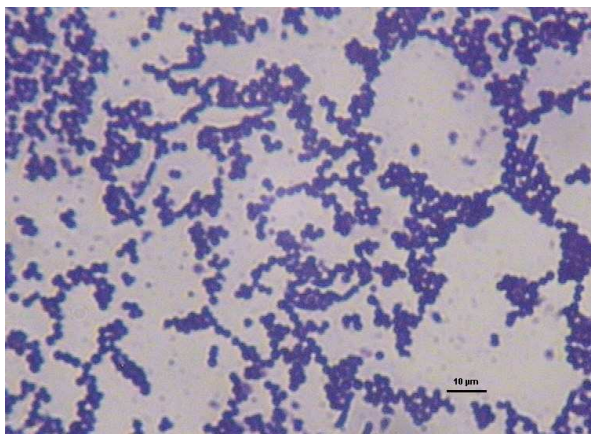


*Holandia aerobní kultivace*

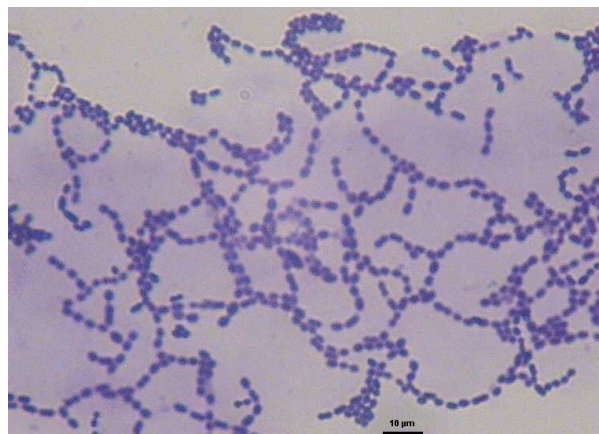


*Holandia anaerobní kultivace*

### 8.4. Preparáty Gramovo barvení - Kefír



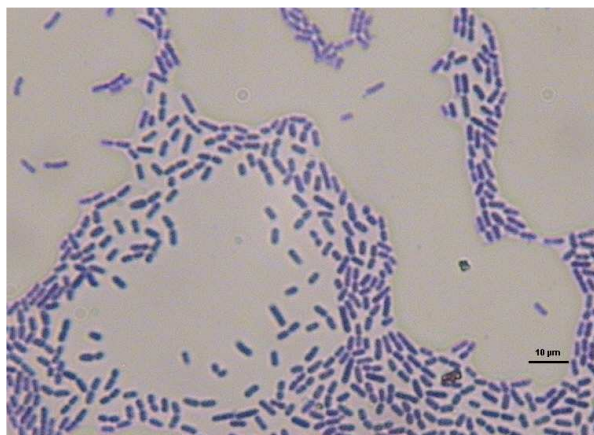
*Kefír aerobní kultivace*



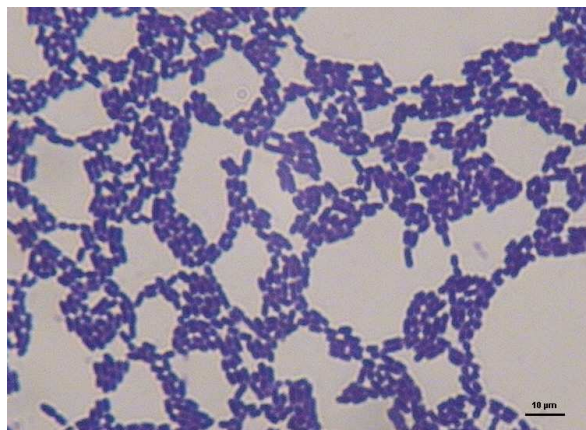
*Kefír anaerobní kultivace*



## 8.5. Preparáty Gramovo barvení - Revital

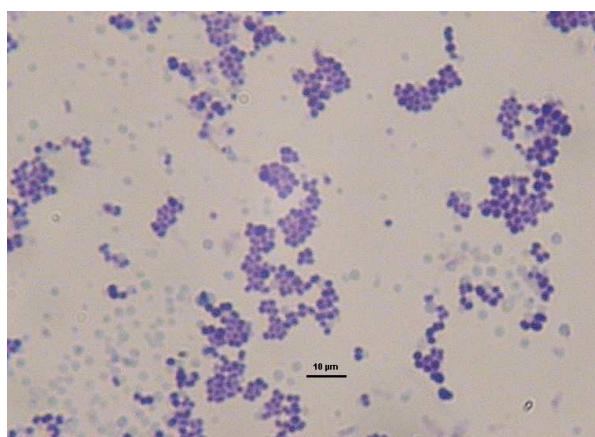


*Revital aerobní kultivace*

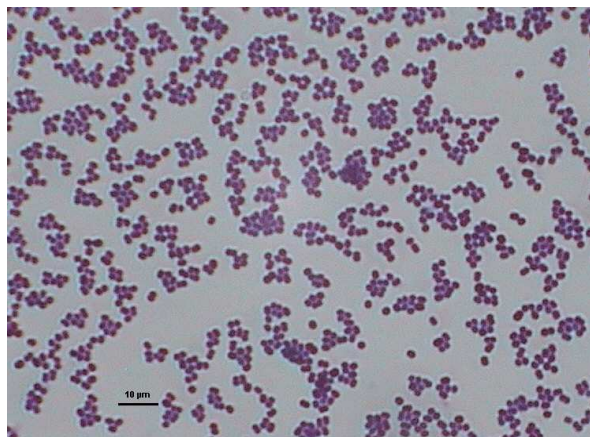


*Revital anaerobní kultivace*

## 8.6. Preparáty Gramovo barvení - Zeus

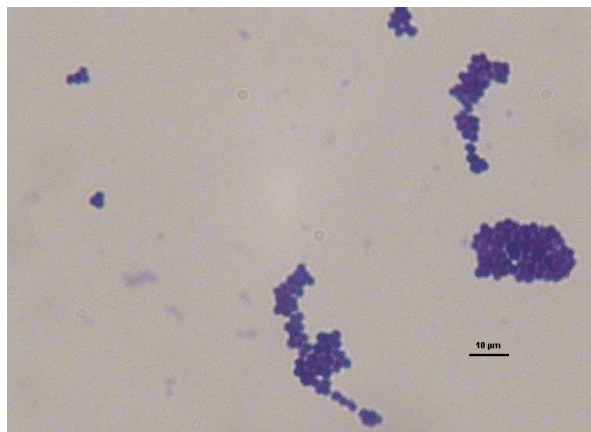


*Zeus aerobní kultivace*

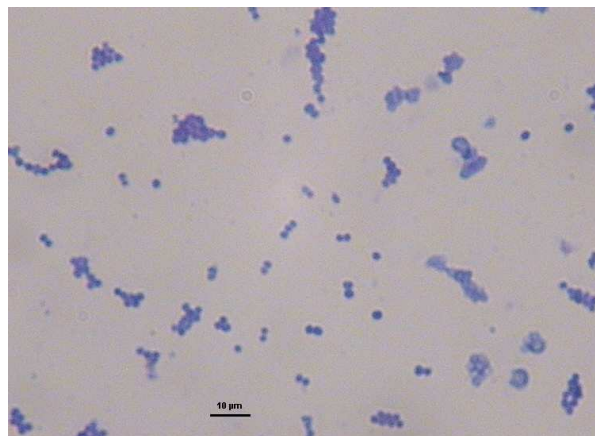


*Zeus anaerobní kultivace*

### 8.7. Preparáty Gramovo barvení - Hádes



*Hádes aerobní kultivace*

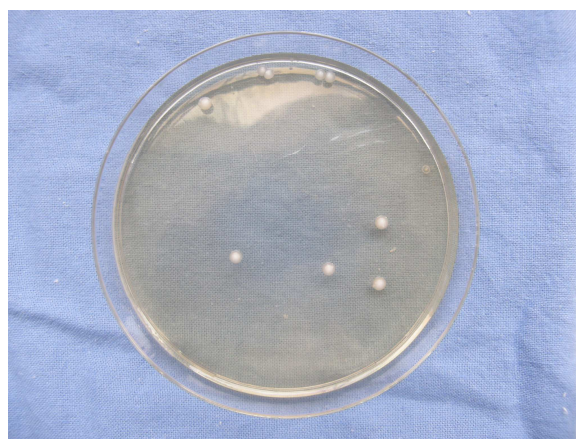


*Hádes anaerobní kultivace*

### 8.8. Petriho misky po kultivaci na MSMA

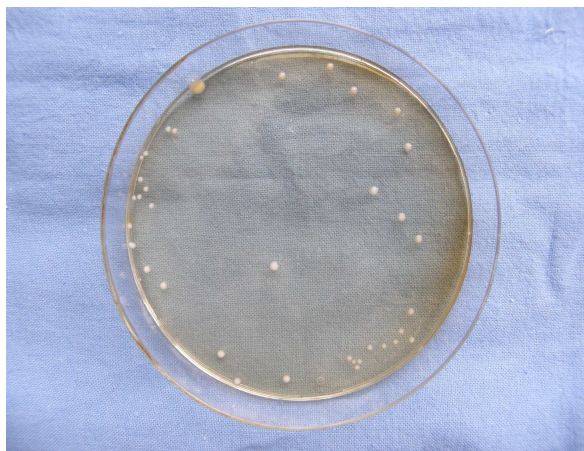


*Aerobní kultivace MSMA*

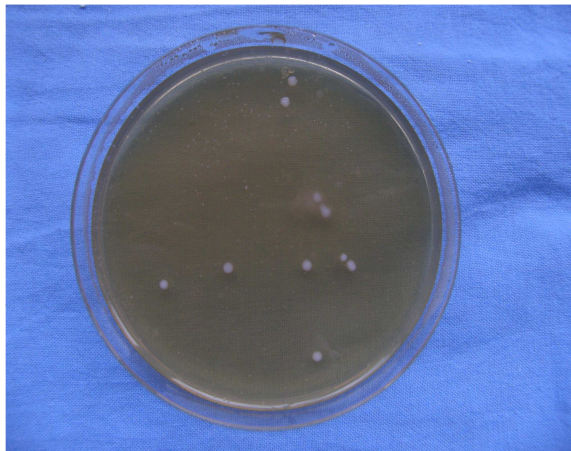


*Anaerobní kultivace MSMA*

### 8.9. Petriho misky po kultivaci na MRS



*Aerobní kultivace MRS*



*Anaerobní kultivace MRS*